

**Versuche
zur Synthese einer Partialsequenz der
Streptococcen-Protease (EC 3.4.4.18)
nach der Festphasen-Methode
und auf klassischem Wege**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**von
Eugen Schalch
aus Metzingen/Württ.**

Marburg/Lahn 1973

Versuche
zur Synthese einer Partialsequenz der
Streptococcen-Protease (EC 3.4.4.18)
nach der Festphasen-Methode
und auf klassischem Wege

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Eugen Schalch
aus Metzingen/Württ.

Marburg/Lahn 1973



Vom Fachbereich Chemie als Dissertation angenommen am 25.9.1973

Dekan: Prof. Dr. H. Klamberg

Berichterstatter: Prof. Dr. Fr. Schneider

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.1973

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider im September 1968 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen begonnen und ab September 1970 am Physiologisch-Chemischen Institut II der Universität Marburg fortgesetzt.

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Friedhelm Schneider, danke ich herzlich für die stete und vielseitige Förderung, die er mir während der Arbeit zuteil werden ließ.

Herrn Prof. Dr.Dr. G. Weitzel (Direktor des Physiol.-Chem. Instituts der Universität Tübingen) danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zu Beginn dieser Dissertation.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553806_0015

Zusammenfassung

1. Die Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptococcen-Protease (EC 3.4.4.18), die die essentielle SH-Gruppe des Enzyms enthält, bestehend aus den 27 Aminosäuren

Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys ,

wurde nach der Festphasensynthese und auf klassischem Wege versucht.

2. Das Standardverfahren der Festphasensynthese (Merrifield-Synthese) mit dem p-Methoxybenzylrest als SH-Schutzgruppe des Cysteins, dem Benzyloxycarbonylrest als ϵ -Amino-Schutzgruppe des Lysins und ungeschütztem Imidazolrest des Histidins führte nach Ausweis der Aminosäureanalyse und chromatographischer Tests nicht zu einem brauchbaren Produkt. Auch eine Festphasensynthese mit Verwendung des Blockers β -Sulfopropionsäureanhydrid, der nicht umgesetzte Aminogruppen blockieren und die Abtrennung von Rumpfsequenzen erleichtern soll, brachte keine Verbesserung der Ergebnisse.
3. Als Hauptursache für das Versagen der Merrifield-Synthese bei der Herstellung der Partialsequenz wurde das Fehlen eines geeigneten Histidin-Derivates und die mangelnde Stabilität der allgemein verwendeten Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe der ϵ -Aminofunktion des Lysins erkannt. Besonders der mangelhafte Schutz der ϵ -Aminogruppe des Lysins wirkte sich für die Synthese verhängnisvoll aus, da das Lysin carboxylendständige Aminosäure ist und 26-mal dem Abspaltungscyclus für die Boc-Schutzgruppe unterliegt. Mit dem üblicherweise verwendeten Boc-Histidin wurden wegen der Schwerlöslichkeit dieses Derivates sehr schlechte Kupplungsausbeuten erzielt.

4. Auf der Suche nach den für die Merrifield-Synthese am besten geeigneten Histidin-Derivaten wurden 25 mit verschiedenen Schutzgruppen der Amino- und/oder Imidazolfunktion versehenen Histidine in Bezug auf Kupplungsausbeute und Stabilität der Imidazol-Schutzgruppe an einem Modellpeptidharz getestet. Dabei erwies sich das bisher gebräuchlichste Boc-His als am wenigsten geeignet. 100 %ige Kupplungsausbeuten wurden mit Boc-His(Boc)-ONp, Adoc-His(Adoc) und Boc-His(Z)-ONp erhalten. Alle geprüften Imidazol-Schutzgruppen mit Ausnahme des Benzyl- und Dinitrophenylrestes erwiesen sich unter den Bedingungen der Merrifield-Synthese als nicht stabil. Eine Kontrolle der Kupplungsausbeute bei der Synthese durch Titration der bas. Gruppen (Dorman-Titration) ist daher bei Vorhandensein von Histidin in der Peptidkette unzuverlässig.
5. Für das Boc-His(Boc)-ONp, das sich im Hinblick auf Kupplungsausbeuten, Handhabung und Löslichkeit besonders bewährt hat, wurden zwei neue Synthesen ausgearbeitet, die das nur schwer zugängliche bisher für die Synthese verwendete Boc-fluorid nicht erfordern.
6. Modelluntersuchungen an Peptidharzen mit verschiedenen geschützten Lysin-Derivaten zeigten, daß der ϵ -Benzyloxycarbonylrest pro Kupplungscyclus zu ca. 1 % abgespalten wird. Dagegen erwiesen sich der Diisopropylmethyloxycarbonyl-, der p-Nitrobenzyloxycarbonyl- sowie der Phthalylrest als stabil. An der ϵ -Aminogruppe durch Phthalyl geschütztes Lysin kuppelt aber nur mit etwa 80 % Ausbeute. Der p-Nitrobenzyloxycarbonylrest ist nur hydrogenolytisch abspaltbar.
7. Nach Scheitern der Synthese der Partialsequenz an einem Stück wurde die Synthese über Fragmente versucht, die nach der Merrifield-Synthese erhalten wurden. Zu diesem Zweck wurde die Sequenz in fünf Teilstücke zerlegt, die als geschützte Peptidhydrazide bez. -Amide folgender Struktur

für eine Fragmentkondensation verwendet werden sollten:

I Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-N₂H₃

II Z-Glu(OBut)- bzw. Boc-Glu(OBut)-Gln-Ser(OBzl)-Phe-Val-Gly-N₂H₃

III Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-N₂H₃

IV Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-N₂H₃

V Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂

Die Synthese dieser Fragmente an fester Phase war ein vollständiger Mißerfolg. Die Hydrazide II, III und IV und das Amid sind sehr schwer löslich. Dadurch erklärt sich u.a. die geringe Ausbeute bei Hydrazinolyse bzw. Aminolyse der Peptidharze. Außerdem waren die Produkte nicht einheitlich und ließen sich wegen der außerordentlichen Schwerlöslichkeit nicht vernünftig reinigen.

8. Nach dem Scheitern der Festphasen-Synthese wurden Versuche zur Synthese der Partialsequenz nach den klassischen Verfahren durchgeführt. Dazu wurde das Gesamtpeptid in dieselben Fragmente I bis V wie bei der Merrifield-Synthese zerlegt (s.o.). Dieses Verfahren erlaubte einen direkten Vergleich der Eigenschaften und Reinheit klassisch und nach Merrifield synthetisierter Peptide. Die Schutzgruppen der trifunktionellen Aminosäuren und ihre Kombinationen wurden dabei mehrfach variiert mit dem Ziel, die Löslichkeit der Fragmente zu verbessern. Sämtliche Teilpeptide wurden als geschützte Peptidester, Peptidhydrazide oder Peptidsäuren in analytisch reiner Form erhalten. Ein Teil von ihnen, so das Fragment II, IV und V erwiesen sich als sehr schwer löslich. Die Verknüpfungen der Teilstücke ist daher im wesentlichen ein Löslichkeitsproblem. Peptid 1-4 konnte mit Peptid 5-10 zu einem löslichen Decapeptid Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH verknüpft werden, das für die weitere Synthese geeignet ist. Die Überführung dieser Peptidsäure in einen p-Nitrophenylester gelang nicht quantitativ. Die Peptidsäure 18-25 Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-OH ließ sich in reiner Form darstellen. Die

Verknüpfung der übrigen Teilstücke zur Gesamtsequenz steht noch aus.

9. Die Verwendung der Glutaminamid-Schutzgruppen 4-Methoxybenzyl- und 4,4'-Dimethoxybenzhydryl brachten in keinem Fall eine Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften der Peptide; die Schutzgruppen verhindern aber die Bildung von Pyroglutaminsäure bei der Synthese Glutamin-haltiger Peptide.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzungen und Symbole für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate richten sich nach den von der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur herausgegebenen Regeln:

J. biol. Chemistry 241, 2491 (1966)

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 356 (1967)

Weitere Abkürzungen:

Gln(Pmb)	Glutaminsäure- γ -p-Methoxybenzylamid
Gln(DMBH)	Glutaminsäure- γ -[4,4'-Dimethoxybenzyl]-amid
(Isobut)	Isobutyloxycarbonyl-
Dipmoc	Diisopropylmethyloxycarbonyl-
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DC-Harnstoff	Dicyclohexyl-Harnstoff
SEt	Äthylmercapto-
Ac	Aceton
Chlf	Chloroform
DMF	Dimethylformamid
EtOAc	Äthylacetat
EtOH	Äthanol
HAc	Essigsäure
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
MeOH	Methanol
TAA	Triäthylamin
THF	Tetrahydrofuran

Inhaltsverzeichnis

Seite

A	Allgemeiner Teil	
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Synthesepläne	5
2.1.	Synthese nach der Merrifield-Methode an einem Stück	5
2.2.	Synthese von Peptidfragmenten nach Merrifield und die Verknüpfung der Fragmente nach klassischen Methoden	9
2.3.	Strategie für die klassische Synthese der Partialsequenz	10
3.	Untersuchungen über die Eignung verschiedener Histidin-Derivate für die Merrifield-Synthese	16
3.1.	Kupplungsausbeuten verschiedener Histidin-Derivate	19
3.2.	Stabilität der Histidin-Derivate	20
3.3.	Dorman-Titration Histidin-haltiger Peptide	22
3.4.	Schlußfolgerungen	22
4.	Untersuchungen über die Eignung verschiedener Lysin-Derivate für die Merrifield-Synthese	24
5.	Diskussion der Ergebnisse	29
5.1.	Verlauf der Synthesen nach Merrifield an einem Stück	29
5.2.	Verlauf der Synthesen von Peptidhydraziden nach der Merrifield-Methode	36
5.3.	Klassische Synthesen der Teilsequenzen	38

6.	Generaldiskussion	56
6.1.	Merrifield-Synthesen	56
6.2.	Klassische Synthesen	58
B	Experimenteller Teil	
1.	Allgemeines	62
2.	Verzeichnis der Literaturpräparate	65
3.	Merrifield-Synthesen	75
4.	Synthesen der Histidin-Derivate	80
5.	Klassische Synthesen	86
5.1.	Sequenz 22-27 (Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys)	86
5.2.	Sequenz 16-21 (His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala)	99
5.3.	Sequenz 11-15 (Gln-Ala-Ala-Thr-Gly)	113
5.4.	Sequenz 5-10 (Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly)	124
5.5.	Sequenz 1-4 (Val-Lys-Pro-Gly)	140
5.6.	Sequenz 16-27 (His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys)	149
5.7.	Sequenz 18-25 (Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile)	150
5.8.	Sequenz 5-15 (Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly)	151
5.9.	Sequenz 1-10 (Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly)	152
C	Literaturverzeichnis	154

A Allgemeiner Teil

1. Einleitung und Fragestellung

Enzyme, deren Aktivität von einer SH-Gruppe abhängt, die unmittelbar am katalysierten Prozess beteiligt ist, finden sich vor allem unter den Oxydoreduktasen, Transferasen und Hydrolasen. Falls eine solche essentielle SH-Gruppe eines Enzyms nicht Partner einer Redoxreaktion ist, wie z.B. in der Glutathionperoxydase [1] bildet in den meisten Fällen ihre hohe nucleophile Reaktivität gegenüber elektrophilen Zentren von Substraten die Grundlage ihrer Beteiligung und Wirkung bei der Katalyse.

Eine Reihe von Untersuchungen haben nun gezeigt, daß sich diejenigen SH-Gruppen, die unmittelbare Partner der Katalyse sind, durch stark erhöhte Reaktivität im Vergleich mit vielfach anderen noch im Protein vorhandenen SH-Gruppen auszeichnen; das läßt sich z.B. an der Geschwindigkeit der Reaktion mit elektrophilen Agentien wie Jodacetat, N-Äthylmaleinimid, 2,4-Dinitrofluorbenzol u.a. messen. So ist z.B. die Reaktivität der essentiellen SH-Gruppe der Streptococcal-Protease (EC 3.4.4.18) 50 bis 100 mal größer als die des Glutathions [2] und beim Papain beträgt der Faktor 200 [3].

Eines der zahlreichen bisher ungelösten Probleme des Mechanismus der Enzymkatalyse ist die Frage, wie die Erhöhung der Reaktivität einzelner, am katalytischen Prozess direkt beteiligter funktioneller Gruppen zustande kommt [4].

In den meisten Fällen steht die nucleophile Reaktivität einer Gruppe in direkter Beziehung zum pK-Wert; das gilt auch für die SH-Gruppe, denn das eigentliche nucleophile Agens ist das Thiolation. Jede Änderung des pK-Wertes führt daher auch zu einer Änderung der nucleophilen Reaktivität der SH-Gruppe. Eine Änderung der Dissoziationskonstante ist z.B. durch Änderung der Dielektrizitätskonstante und Ionenumgebung oder

durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu erwarten. Beide Möglichkeiten sind in Enzymproteinen realisiert, wobei vor allem die Beteiligung einer Wasserstoffbrücke an der Erhöhung der Reaktivität von verschiedenen Autoren postuliert wird, da der pK-Wert des Donators des H-Atoms - in diesem Fall der SH-Gruppe - erhöht und der des Acceptors erniedrigt wird.

Für eine Anzahl von Enzymen, zu denen z.B. das Papain [5] (EC 3.4.4.10), β -Amylase [6] (EC 3.2.1.2.), β -Galaktosidase [7] (EC 3.2.1.23), intestinale alkalische Phosphatase [8] (EC 3.1.3.1), Streptococcen-Protease [2] (EC 3.4.4.18) weiter Alkoholdehydrogenase [9] (EC 1.1.1.1) und Kreatinkinase [10] (EC 2.7.3.2) gehören, wird angenommen, daß die Erhöhung der Reaktivität der essentiellen SH-Gruppe dieser Enzyme durch Kooperation mit einem Imidazolrest zustande kommt, eventuell über die Bildung einer H-Brücke.

Modelluntersuchungen zu diesem Problem haben gezeigt, daß die Reaktivität von SH-Gruppen in der Tat durch einen ideal benachbarten Imidazolrest über das auf Grund ihres pK-Wertes zu erwartende Maß erhöht werden kann [11,12]. Das ließ sich besonders deutlich an der Reaktion von 4-Mercaptomethyl- bzw. 4-(β -Mercaptoäthyl)imidazol mit verschiedenen elektrophilen Reagenzien wie Bromacetamid [13], N-Äthylmaleinimid [14], 2,4-Dinitrofluorbenzol [15] u.a. sowie der Esterasewirkung [16] dieser Imidazol-SH-Verbindungen demonstrieren.

Die vorliegende Arbeit ist eine konsequente Fortsetzung der Modellstudien zur kooperativen Imidazol-SH-Katalyse. Bisherige Untersuchungen an niedermolekularen Modellverbindungen und Peptiden [12] mit Histidin und Cystein werden in dieser Arbeit auf eine Partialsequenz der oben erwähnten Streptococcen-Protease, die die essentielle SH-Gruppe des Enzyms enthält [2], ausgedehnt. Diese Partialsequenz enthält außer der SH-Gruppe einen Histidinrest, von dem vermutet wurde, daß er für die Katalyse ebenfalls essentiell ist, was bisher aber nicht

bewiesen ist [17].

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen Versuche zur Synthese der aus 27 Aminosäuren bestehenden Partialsequenz der Streptococcen-Protease folgender Struktur:

Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-
Thr-Gly-His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys

Diese Synthese wirft erhebliche methodische Probleme auf.

Die erste prinzipielle Frage, ob die Synthese nach der Merrifield-Methode [18] oder auf klassischem Wege [19,20,21] versucht werden sollte oder durch eine Kombination von Merrifield-Synthese mit klassischer Fragmentkondensation, wurde dahingehend entschieden, daß alle drei Möglichkeiten experimentell geprüft werden. Ein weiteres methodisches Teilproblem, das bisher nicht zufriedenstellend gelöst ist, ist die Auswahl des für die Merrifield-Methode am besten geeigneten Histidinderivates sowie die Wahl der Schutzgruppe für die ϵ -Aminogruppe des Lysins.

Das Programm der vorliegenden Arbeit umfaßt daher folgende Versuche:

1. Synthese der Partialsequenz der Streptococcen-Protease nach der Merrifield-Methode an einem Stück.
2. Synthese der Sequenz unter Verwendung des Blockers β -Sulfopropionsäureanhydrid, der die Abtrennung von Rumpfsequenzen erleichtern soll.
3. Synthese von Fragmenten nach der Merrifield-Methode und Verknüpfung der Fragmente zur Gesamtsequenz.
4. Synthese der Partialsequenz auf klassischem Wege über eine Fragmentkondensation von nach klassischen Verfahren aufgebauten geschützten Teilpeptiden.
5. Untersuchungen über die Kupplungsausbeuten verschiedener geschützter Histidinderivate mit Glycinharz.

6. Prüfung der Stabilität verschiedener Schutzgruppen für die ϵ -Aminofunktion des Lysins unter den Bedingungen der Merrifield-Synthese.

Diese Untersuchungen sollten weiterhin einen Vergleich der Festkörpersynthese nach Merrifield mit der klassischen Fragmentkondensation auf der Basis eines vom selben Bearbeiter durchgeführten Syntheseprogramms ermöglichen und damit einen Beitrag zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Festphasensynthese im Vergleich zur klassischen Synthese liefern. Die Partialsequenz soll als Modellpeptid für weitere Untersuchungen über die Reaktivität von SH-Gruppen und ihre Beeinflussung durch ihre unmittelbare Nachbarschaft in Proteinen dienen.

2. Synthesepäne

2.1. Synthese nach der Merrifield-Methode an einem Stück

Das Peptid sollte an dem üblichen Polystyrol-Divinylbenzol-Träger mit 2 %iger Vernetzung [22] aufgebaut werden. Für die Veresterung der ersten Aminosäure (Lysin) mit dem Harz sollte ebenfalls die übliche Methode des Umsatzes von chlormethyliertem Harz mit dem Triäthylammoniumsalz der N-geschützten Aminosäure angewandt werden [18].

Für die Kupplung der einzelnen Kopfkompenten mit dem wachsenden Peptidpolymer war die erprobte Umsetzung der Boc-Aminosäuren mit DCCI in Methylenchlorid bzw. je nach Löslichkeit in DMF vorgesehen. Nur bei Glutamin war man auf den Einsatz des p-Nitrophenylesters angewiesen, um eine mögliche Dehydratisierung mit DCCI zu vermeiden [23].

Da die Sequenz insgesamt 13 trifunktionelle Aminosäuren enthält und für jeden Kupplungsschritt ein fünffacher Überschuß vorgesehen war, war es erstrebenswert, die Drittfunktionen möglichst dauerhaft zu schützen.

Für diesen Schutz kamen in Frage:

Bei Lysin die bis dahin [24] fast ausschließlich angewandte ϵ -Z-Verbindung; bei Serin und Threonin die Benzyläther, nachdem eine - wenn auch verlustreiche - Synthese für Boc-Thr(Bzl) beschrieben worden war [25]; bei Glutaminsäure der γ -Benzylester.

Für die SH-Gruppe des Cysteins sollte auf keinen Fall der Benzylrest [26] verwandt werden, um eine Deblockierung des fertigen Peptids mit Na/fl. NH_3 zu vermeiden, weil dabei Peptidschädigungen unausbleiblich sind [27].

Die Entscheidung fiel hierbei auf den p-Methoxybenzylrest [28], der einerseits genügend stabil sein sollte, die nach

der Kupplung des Cysteins noch nötigen 17 Deblockierungsschritte mit HCl/Eisessig und Neutralisierungsschritte mit Triäthylamin zu überstehen; andererseits sollte zum Schluß der Synthese eine vollständige Deblockierung mit HF gewährleistet sein. Allerdings war der p-Methoxybenzyl-Rest zu Beginn der vorliegenden Arbeit an größeren Peptiden noch nicht erprobt. Klassische Insulin A-Ketten-Synthesen mit dieser Schutzgruppe [29,30] waren noch nicht abgeschlossen.

Außer dem schon erwähnten Benzylrest wurden noch folgende Schwefel-Schutzgruppen in die Überlegungen mit einbezogen:

a) Der von COHEN und HOLLAND in die Schwefelchemie eingeführte Tetrahydropyranoylrest [31]. Die ersten Erprobungen dieses Restes wurden 1968 von HAMMERSTRÖM [32] abgeschlossen, und zwar bei der Merrifield-Synthese der Insulin-Sequenz B 1 - 8 [33,34]. Hierbei erschien diese Schutzgruppe als recht günstig, wenig später konnte jedoch gezeigt werden, daß alle Reagenzien, die den Boc-Rest abspalten, wie z.B. HCl/Eisessig, auch die Tetrahydropyranoyl-Gruppe teilweise angreifen [35,36]. Man hätte also zumindest vom Cystein ab mit den säurelabilen, aber aufwendiger darzustellenden Bpoc-Derivaten der Aminosäuren [37,38,39,40,41] - einige von ihnen sind oder waren noch nicht beschrieben - arbeiten müssen.

b) Die S-Äthylmercapto-Schutzgruppe und homologe unsymmetrische Disulfide des Cysteins.

Die S-Äthylmercaptogruppe wurde 1967 von japanischen Autoren in die klassische Peptidchemie eingeführt [42] und von WEBER später für die Merrifield-Synthese der Insulin A-Kette herangezogen [43,44]. WEBER hat auch die Stabilität dieser Schutzgruppen in Bezug auf den Disulfid-Austausch untersucht [45,46,47] und dabei festgestellt, daß einerseits die t-Butylmercapto-Gruppe zwar am wenigsten anfällig ist, andererseits aber auch mit Mercaptanen oder mittels oxydativer Sulfitolyse am schlechtesten abzuspalten ist. Außerdem wurde darauf hingewiesen, daß die Abspaltung im Peptidverband schwieriger sein wird als beim Monomeren. Von WEBER wird jetzt die Verwendung der Isopropyl-

mercapto-Schutzgruppe als Kompromiß zwischen Stabilität und Abspaltbarkeit vorgeschlagen.

Insgesamt schien für den vorliegenden Fall der Einsatz dieser Schutzgruppen zu riskant, zumindest ohne vorher ausgiebige Modellstudien durchgeführt zu haben.

Über den Einsatz von Histidin bei der Merrifield-Synthese lagen zu Beginn der Arbeit außer mit dem Im-Benzyl-Derivat keine Erfahrungen vor. Allerdings war eine Arbeit erschienen [48], in der am Imidazolkern ungeschütztes Histidin verwendet wurde; dabei war jedoch Histidin aminoendständig. 1-Benzyl-Histidin erfordert zur Abspaltung Natrium in fl. Ammoniak, schied also von vornherein aus, sodaß der Versuch gemacht wurde, Boc-Histidin zu benutzen. Bestärkt wurde dieses Vorhaben noch dadurch, daß zu Beginn der Arbeit die Synthese der Ribonuclease von GUTTE und MERRIFIELD beschrieben wurde, die ebenfalls am Imidazol ungeschütztes Histidin verwendeten [49].

Der Einsatz von Methionin wurde ohne Schutz der Thioäthergruppierung vorgesehen, wie es von MERRIFIELD [50] zunächst vorgeschlagen wurde. Allerdings hat MERRIFIELD selbst dann bei der Synthese der Ribonuclease Boc-Met(O) eingesetzt.

Die Amidgruppen in der Seitenkette des Glutamins sollten ungeschützt bleiben, wie bis vor kurzer Zeit üblich aus Mangel an geeigneten, erprobten Gruppen [51,52], obwohl Anzeichen für eine Pyroglutaminsäure-Bildung am Harz beschrieben waren [53]. Jedoch berichtete BEYERMAN 1971, daß bei dem Peptid Gln-Gly-Polymer mit 4 N HCl/Dioxan nach 70 Stunden keine, mit 1 N HCl in Eisessig 1 %, mit TFA 4 % und TFA/Methylenchlorid (1:1) 11 % Pyroglutaminsäurebildung festzustellen war [54].

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen sollte mit 1 N HCl/Eisessig erfolgen, vor allem deshalb, damit eine Bestimmung freier Aminogruppen durch Chlorid-Titration erst nach VOLHARD

und dann nach DORMAN [55] möglich war. Alle anderen beschriebenen Methoden der Umsatzkontrolle haben sich für den präparativen Routinebetrieb nicht bewährt, z.B. der Edman-Abbau mit nachfolgender massenspektrometrischer Verdünnungsanalyse [56] oder die Scintillationsanalyse bei Verwendung radioaktiv markierter Isocyanate [57], die spektrophotometrische Verfolgung der Reaktion mit 2-Hydroxy-1-Naphthaldehyd [58] bzw. Ninhydrin [59]. Außerdem erfordern alle genannten Reaktionen chemische Umsetzungen mit den nicht umgesetzten Aminogruppen und unterliegen damit der gleichen Unsicherheit, nämlich unvollständiger Reaktion, wie die zu bestimmende Reaktion selbst.

Da nicht zu erwarten war, daß die Synthese bei jedem Schritt zu einem 100 %igen Umsatz der Aminogruppen führen würde und damit Rumpfsequenzen unvermeidlich waren, wurde gleichzeitig daran gedacht, mit einem Blocker der nicht umgesetzten Aminogruppen zu arbeiten. Als Blocker war zu Beginn der Arbeit nur das Acetanhydrid versucht worden [50], was sich jedoch nicht bewährte, da die Abtrennung acetylierter Rumpfsequenzen nicht möglich ist. Als schließlich 1970 von WISSMANN und GEIGER das Anhydrid der β -Sulfopropionsäure vorgeschlagen wurde [61], sollte die Gesamtsequenz mit Hilfe dieses Blockers synthetisiert werden. Die Verwendung des größeren aromatischen Restes O-Nitrophthalsäureanhydrid [62] erschien nicht so günstig. Bei beiden Gruppen entsteht nach der Reaktion eine saure Funktion am Rumpfpeptid, so daß - anders als beim acetylierten Peptid - eine Abtrennung mittels Ionenaustausch-Chromatographie möglich sein sollte. Einschränkend ist natürlich auch hierbei wieder zu erwähnen, daß eine freie Aminogruppe im wesentlichen aus sterischen Gründen nicht mit einer Boc-Aminosäure reagieren wird, deshalb dürften auch die genannten Acylierungsreaktionen keinen vollständigen Umsatz garantieren. Andererseits ist durchaus denkbar, daß sich mit wachsender Peptidkette die Konformation des Peptidpolymers ändert, sodaß zunächst nicht zugängliche Aminogruppen später wieder acylierbar werden und damit zu Fehlsequenzen Anlaß geben können.

Für die Abspaltung des synthetisierten Peptids vom Harz war schließlich die übliche Methode, nämlich HBr/TFA vorgesehen, wobei allerdings zum Schutz des Methionins vor der Bildung des Benzylsulfonium-Derivats (aus den bei der Abspaltung der Benzylreste aus Glu und Lys entstehenden Benzylkationen) die Zugabe eines Kationenfängers (Anisol) eingeplant wurde.

Damit würden gleichzeitig alle Schutzgruppen, mit Ausnahme des p-Methoxybenzylrestes am Cystein, abgespalten. Die Darstellung des SH-Peptids erforderte dann die schon erwähnte Behandlung mit wasserfreiem HF.

2.2. Synthese von Peptidfragmenten nach Merrifield und die Verknüpfung der Fragmente nach klassischen Methoden.

Da die Synthese größerer einheitlicher Peptide nach der Festphasenmethodik trotz intensiver Reinigungsoperationen sehr häufig nicht gelingt [vgl. 63], lag es nahe, kürzere Teilstücke nach dieser Methode darzustellen und diese dann nach klassischen Verfahren zu kuppeln.

Dieses Verfahren ist allerdings mit schwerwiegenden sequenzabhängigen Einschränkungen behaftet:

Erfolgt die Abspaltung vom Harz durch Hydrazinolyse [64], so müssen etwa vorhandene β - bzw. γ -Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure als t-Butylester geschützt sein, was wiederum heißt, daß die α -Aminogruppen eine leichter abspaltbare Schutzgruppe als die Boc-Gruppe verlangen, es sei denn, die Dicarbonsäure steht aminoendständig und kann mit dem Z-Rest geschützt werden; dann darf allerdings keine schwefelhaltige Aminosäure die spätere Hydrogenolyse dieses Restes verhindern. Der Einsatz von Boc-Aminodicarbonsäure-t-Butylestern ist nur dann möglich, wenn die Synthese so angelegt ist, daß nach Deblockierung eine freie β - oder γ -Carboxylgruppe die weiteren Verknüpfungen nicht stört.

Für eine basenkatalysierte Umesterung [65] mit Methanol gelten

die gleichen Einschränkungen, dazu kommt noch die Gefahr der Racemisierung, ebenso bei der alkalischen Hydrolyse vom Harz.

Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen und der Verteilung der Glycin-Reste im Gesamtmolekül bot sich zunächst die Synthese folgender Hydrazide an:

- I. Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-N₂H₃
- II. Z-Glu(OBut)-Gln-Ser(Bzl)-Phe-Val-Gly-N₂H₃
- III. Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-N₂H₃

Das carboxylendständige Dodecapeptid wurde in zwei Hexapeptide geteilt; das carboxylendständige Hexapeptid sollte durch Aminolyse [66] zum Hexapeptidamid vom Harz abgespalten werden:

- IV. Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-N₂H₃
- V. Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂

Die Verknüpfungen sollten dann über die geschützten Peptidazide IV bis I nacheinander erfolgen.

Anders als beim Gesamtpeptid war hier aus wirtschaftlichen Gründen der Einsatz von ungeschütztem Threonin vorgesehen. Der Synthesecyclus sollte wie üblich ablaufen (3 Std. Reaktionszeit), die Kupplungsreagenzien sollten in 5-fachem Überschuß eingesetzt werden.

2.3. Strategie für die klassische Synthese der Partialsequenz

Der Plan für diese Synthese sah einen Aufbau aus 5 Fragmenten vor, nämlich den Peptiden der Sequenz 1-4, 5-10, 11-15, 16-21 und 22-27. Diese Aufteilung bot sich an, weil bei den ersten drei Peptiden Glycin die carboxylendständige Aminosäure ist. Außerdem sollte diese relativ große Anzahl der

Teilpeptide eine größere Variation der letzten Kupplungsstelle ermöglichen. Darüber hinaus war ein direkter Vergleich der "Merrifield-Produkte" mit den "klassischen Produkten" möglich.

Alle Fragmente außer 11-15 weisen charakteristische Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung auf. Dies ist für die Umsatzkontrolle durch eine Aminosäureanalyse nach jeder Kupplungsstufe wichtig. Die Verknüpfung der Fragmente war dann auf verschiedene Weise geplant:

In einem ersten Versuch sollte das Gesamtpeptid, ausgehend von dem Teilstück 22-27, durch schrittweise Verknüpfung der oben erwähnten 4 Fragmente hergestellt werden, und zwar sowohl nach der Azid- [67,68,69] als auch nach der DCCI/Hydroxybenzotriazol-Methode [70]. Beide erfüllen die Forderungen, die man an eine racemisierungsfreie Kondensation von Fragmenten stellt. Erst in neuester Zeit sind auch bei Verwendung der Azid-Methode in einigen Fällen Racemisierungen nachgewiesen worden [71,72,73,74]. Da in den Positionen 4, 10 und 15 jeweils Glycin steht, wären bei drei Fragmenten auch noch die Mixed-Anhydrid-Methode [75] oder Kupplung über einen aktiven Ester in Frage gekommen.

Der zweite Plan sah vor, erst 1-15 darzustellen und dieses Pentadecapeptid mit dem Dodecapeptid 16-27 zu verknüpfen. Wegen Glycin 15 wären prinzipiell wieder alle Methoden der Verknüpfung möglich gewesen.

Zum Dritten sollte das Gesamtpeptid aus 1-10 und 11-27, das wiederum aus 11-15 und 16-27 zusammenzusetzen wäre, aufgebaut werden. Da in Position 10 Glycin steht, wäre man in der Wahl der Kondensationsmethode wieder frei gewesen.

Für das Fragment 22-27 kam als Aminoschutzgruppe nur der Boc-Rest in Frage; sowohl Methionin 26 als auch die vorge-sehene Z-Schutzgruppe für die ϵ -Aminogruppe des Lysins 27

erlaubten eine Anwendung des Z-Restes für die α -Aminogruppe nicht. Damit fiel auch ein t-Butylschutz für Thr weg, die Anwendung von Thr(Bzl) erschien zu aufwendig, zumal die Gesamtsequenz drei Threonin-Reste enthält.

Fragment 16-21 enthält in Position 17 Cystein. Dafür war der p-Methoxybenzylrest eingeplant. Beim Start dieser Sequenz mit Ala-ONB mußte vor Einsatz des Cysteins der Ester hydrogenolytisch gespalten werden.

Die Sequenzen 1-4, 5-10 und 11-15 sollten jeweils von Gly-OMe und Gly-ONB ausgehend aufgebaut werden, und zwar je nachdem mit Z- oder Boc-geschützten Aminosäuren. An eine alkalische Verseifung war nicht gedacht.

Für die γ -Carboxylgruppe des Glutaminsäurerestes 5 war sowohl der t-Butyl- als auch der Benzylschutz vorgesehen. Die Glutamin-Amid-Gruppe sollte zunächst ungeschützt, bei auftretenden Schwierigkeiten aber auch geschützt mit dem p-Methoxybenzyl-[76] oder dem 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Rest [77] eingesetzt werden. Nach den guten Erfahrungen von KÖNIG und GEIGER [70] mit OH-freiem Serin bei Anwendung der DCCI-Hydroxybenztriazol-Methode war daran gedacht, dieses Verfahren zu übernehmen. Erst bei Schwierigkeiten sollte statt dessen Ser(But) eingesetzt werden.

Die Strategien der klassischen Synthesen sind aus den nachfolgenden Syntheseschemata ersichtlich:

Abb. 2 und 2 a : Synthesepan der Gesamtsequenz: Kondensation von Sequenz 1-15 mit Sequenz 16-27

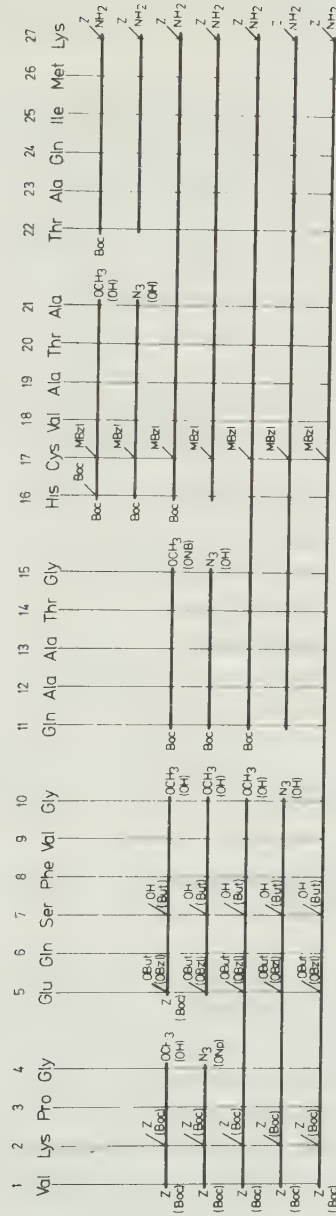


Abb. 3 : Syntheseplan der Gesamtsequenz: Kondensation von Sequenz 1-10 mit Sequenz 11-27

3. Untersuchungen über die Eignung verschiedener Histidin-Derivate für die Merrifield-Synthese

Wie schon erwähnt, wurde bisher für die Merrifield-Synthese histidinhaltiger Peptide hauptsächlich Boc-His und Boc-His (Bzl) verwendet, das zur Abspaltung des Benzylrestes die Behandlung des fertigen Peptids mit Natrium in fl. Ammoniak erfordert. Wie sich in der vorliegenden Arbeit herausstellte (s.S. 29) ist Boc-His wegen seiner Unlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln ein völlig ungeeignetes Histidin-Derivat für die Festphasensynthese. Für den Fortgang der Arbeit war es also unumgänglich, eine systematische Untersuchung über die mit verschiedenen Histidinderivaten zu erzielenden Kupplungsausbeuten bei der Merrifield-Synthese durchzuführen.

Dabei waren folgende Gesichtspunkte zu berücksichtigen:

1. Welche Schutzgruppen der Aminofunktion und des Imidazolrestes und welche ihrer Kombinationen geben die besten Kupplungsausbeuten?
2. Wie ist die Stabilität der Imidazolschutzgruppen unter den Bedingungen des Kupplungszyclus?
3. Kann nach Freisetzung der Aminogruppe aus dem Hydrochlorid (oder Trifluoracetat) während des Synthesesyclus eine inter- oder intramolekulare Übertragung von Imidazolschutzgruppen auf Aminogruppen erfolgen?

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Histidin-Derivate sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Für Boc-His(Boc)-ONp wurden zwei neue Synthesen ausgearbeitet, die das von SCHNABEL verwendete, nur schwer zugängliche Boc-Fluorid [78,79] nicht erfordern. Die erste Synthese geht von Boc-Azid und Histidin-p-Nitrobenzylester oder -Benzylester aus, sie führt in 38 %iger Ausbeute bezogen auf das eingesetzte Histidin zum gewünschten Endprodukt, das in allen Eigenschaften mit dem von SCHNABEL beschriebenen Produkt übereinstimmt. Die zweite Synthese geht aus vom Boc-Chlorid

und Histidin und führt ebenfalls zum gewünschten p-Nitrophenylester.

Diese Synthesen sind besser als die ebenfalls von uns gefundene und auch kürzlich von LI beschriebene [80], bei der das als Nebenprodukt bei der Synthese des Boc-His anfallende Boc-His(Boc) als DCHA-Salz isoliert wird. Dabei läßt sich das DCHA-Salz in einer Ausbeute von nur 15-20 % (LI 23 %) bezogen auf His gewinnen. Die Isolierung des Boc-His(Boc) aus dem DCHA-Salz gelang nur in einer Ausbeute von 60-70 %, LI erhielt 94 % Ausbeute.

Die anderen in der Tabelle 1 aufgeführten His-Derivate wurden, soweit sie nicht beschrieben sind, durch Acylierung bzw. Sulfonylierung von Boc-His erhalten; weitere Einzelheiten s. experimenteller Teil.

Tabelle 1 : Kupplungsausbeuten verschiedener Histidin-Derivate mit Gly-Gly-Ala-Harz bzw. Gly-Harz
Reaktionsbedingungen: 5-facher Überschuß, 3 Std.
Reaktionszeit bzw. 15 Std. bei p-Nitrophenylestern

Histidin-Derivat	Kupplungsausbeute % (lt. AS-Analyse)		
	Gly-Gly-Ala-Harz	Gly - Harz	
	a	a	b
Boc-His [81,79]	34-80	34	115
Boc-His(Z)	30-48	-	-
NPS-His[82] + OSu	50	51	58
Boc-His(Isobut)	55	-	-
NPS-His	59	62	62
NPS-His(Tos) [83]	69	-	-
Bpoc-His(Boc) [80]	69	-	-
Z-His [84]	78	88	-
Boc-His(Boc-TF) [85]	83	-	-
Boc-His(Dnp)* [86]	83	51	93
Boc-His(Z-NO ₂)-ONp	83	-	-
Boc-His(Z-NO ₂)	84	-	-
Boc-His(Tos) + HOBT	84	-	-
Boc-His(Tos)-ONp	86	-	-
Boc-His(Boc)	88	-	-
Bpoc-His [80]	94	-	-
Z-His(Z) [84]	95	94	-
Boc-His(Bzl)** [87]	101	100	105
Adoc-His(Adoc) [88]	102	-	-
Boc-His(Boc)-ONp	100	98	100
Boc-His(Z)-ONp	100	-	-
Boc-His(Isobut)-ONp	107	-	-
Z(OMe)-His(ZOMe)-ONp	108	-	-
Boc-His(Dns)	117	-	-
Z(OMe)-His	118	-	-

a) Hydrolyse nach Behandlung mit HCl/Eisessig b) Hydrolyse vor Behandlung mit HCl/Eisessig

*) Als Dnp-His bestimmt. Bei der Analyse taucht ein unidentifizierter Peak an der Stelle auf, wo normalerweise Asp erscheint. Beim Stehen in Citratpuffer pH 2,2 ändert sich der C_{HW}-Wert von 97,6 auf 83,9 nach 1 Tag, auf 63,2 nach 2 Tagen. Nach der Lit. [89] soll His(Dnp) mit 76 % des His-Faktors berechnet werden.

**) Als His(Bzl) bestimmt.

3.1. Kupplungsausbeuten verschiedener Histidin-Derivate

Zur Prüfung der Frage 1 wurden die Kupplungsausbeuten der in Tab. 1 aufgeführten Histidin-Derivate mit einem Modellpeptid unter Standardbedingungen bestimmt. Als Modellpeptid diente ein Gly-Gly-Ala-Harz, das eine Beladungsdichte von 0,5 mMol/g Harz besaß und durch Umsetzung von Ala-Harz mit Boc-Gly-Gly in DMF unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol mit einer Ausbeute von 100 % erhalten wurde (Dorman-Titration und Aminosäureanalyse). An jeweils 1 g des Peptidharzes wurde das betreffende Histidin-Derivat mit DCCI bei 3 Stunden Reaktionszeit und 5-fachem Überschuß gekuppelt, im Fall der p-Nitrophenylester betrug die Reaktionszeit 15 Stunden.

Insgesamt wurden 25 Derivate des Histidins untersucht und die Kupplungsausbeuten durch Aminosäureanalyse nach Behandlung des Harzes mit HCl/Eisessig bestimmt. Führt man die Aminosäureanalyse vor dieser Behandlung durch, erhält man häufig zu hohe Histidinwerte, da sich manche Histidin-Derivate nicht quantitativ auswaschen lassen. In 3-5 Fällen reicht die übliche Behandlung mit HCl/Eisessig zur quantitativen Entfernung nicht gekuppelter Histidin-Derivate offensichtlich noch nicht aus (s. Tab. 1). Einige der Histidin-Derivate wurden zusätzlich auch mit Glycinharz getestet, auch diese Versuchsergebnisse sind in Tab. 1 enthalten.

3.2. Stabilität der Histidin-Derivate

Zur Prüfung der Fragen 2 und 3, der Stabilität der Imidazol-Schutzgruppen, wurden die Histidin-Derivate nach Einwirkung verschiedener Reagenzien auf chromatographischem Wege untersucht. Dabei ergab sich:

Boc-His(Boc): Schon nach 10 Min. Behandlung mit 4 N HCl/Dioxan, TFA oder 1 N HCl/Eisessig sind beide Schutzgruppen quantitativ abgespalten, es ist nur noch Histidin nachzuweisen. Nach Einwirkung von Pyridinhydrochlorid in Methylenchlorid (0,3 M)

sind nach 10 Min. Spuren, nach 30 Min. etwa 10 %, nach 2 Std. 30 % und nach 4 Stunden ca. 60 % Boc-His entstanden. Durch Triäthylamin in Methylenchlorid (10 %ig v/v) und durch Benzylamin in Methylenchlorid (10 %ig v/v) werden beide Schutzgruppen in 4 Stunden nicht abgespalten. Nach 12 Stunden ist jedoch auch hier Boc-His nachzuweisen. Durch Hydrazin und methanolisches Ammoniak wird der Im-Boc-Rest innerhalb von 2 Std. quantitativ abgespalten.

Boc-His(Tos): Nach 30 Min. sind bei der Einwirkung von 4 N HCl/Dioxan und 1 N HCl/Eisessig nur noch Spuren von His(Tos) nachzuweisen, bei TFA sind noch ca. 40 % His(Tos) vorhanden. Nach 4 Stunden lassen sich auch bei der Behandlung mit TFA nur noch Spuren von His(Tos) nachweisen. Pyridinhydrochlorid hat nach einer halben Stunde den Tosylrest zu ca. 90 % abgespalten, nach 2 Std. ist nur noch Boc-His nachzuweisen. Nach der Literatur sollte der Tosylrest beständig gegen TFA sein [83].

Triäthylamin und Benzylamin haben auch nach 4 Std. noch keinerlei Einfluß auf die Stabilität beider Schutzgruppen. Nach STAAB [90] werden Sulfonsäureimidazolide nur bei Temperaturen über 100°C und mehreren Stunden Reaktionszeit durch Amine gespalten. Hydrazin spaltet jedoch den Tosylrest ebenfalls ab.

Boc-His(Dns): Diese Verbindung verhält sich analog zu Boc-His(Tos). Auch hierbei ist mit Trifluoressigsäure eine verzögerte Abspaltung festzustellen.

Adoc-His(Adoc): Mit TFA ist nach 10 Min. 40-50 % Histidin nachzuweisen. Bei Anwendung von HCl/Dioxan und HCl/Eisessig ist auch nach 4 Stunden noch jeweils ca. 50 % Adoc-His(Adoc) vorhanden. Nach 30 Min. sind durch TFA-Einwirkung beide Schutzgruppen quantitativ abgespalten. Triäthylamin und Benzylamin bewirken bei insgesamt je 4-stündiger Anwendung keine Veränderung.

Boc-His(Z): Hier sind bei Einwirkung von HCl/Dioxan nach 30 Min. Histidin und Spuren von His(Z) vorhanden, bei TFA und HCl/Eisessig je ca. 60 % Histidin und 40 % His(Z). Nach 4 Stunden lassen sich nur bei der Behandlung mit HCl/Eisessig noch Spuren von His(Z) nachweisen. Pyridinhydrochlorid hat nach 4 Stunden ca. 40 % des Z-Restes abgespalten. Benzylamin hat nach 10 Min. ca. 80 % und nach 30 Min. 100 % des Z-Restes abgespalten. Im Vergleichschromatogramm ist Benzylcarbaminsäurebenzylester nachzuweisen. Die Abspaltung mit Triäthylamin verläuft wesentlich langsamer: nach 2 Stunden ist noch ca. 70 % Boc-His(Z) vorhanden.

Boc-His(Isobut): Die Verhältnisse entsprechen hierbei dem, was bei Boc-His(Z) gefunden wurde, nur vollzieht sich die saure Abspaltung des Isobutyloxycarbonylrestes langsamer, sodaß nach 30 Min. auch mit HCl/Dioxan noch 50 % His(Isobut) vorhanden sind. Pyridinhydrochlorid hat nach 4 Stunden ebenfalls ca. 40-50 % der Im-Schutzgruppe abgespalten. Mit Benzylamin wird nach 30 Min. eine ca. 50 %ige, nach 2 Stunden eine 100 %ige Abspaltung des Isobutyloxycarbonylrestes erreicht, für Triäthylamin sind die Werte 20 bzw. 40 %. Auch hier läßt sich chromatographisch Benzylcarbaminsäureisobutylester nachweisen. Ob allerdings die Übertragung vom Imidazolid auf das Benzylamin quantitativ verläuft oder ob auch noch Hydrolyse stattfindet, läßt sich nicht entscheiden.

Boc-His(Z-NO₂): Dieses Derivat verhält sich fast genauso wie Boc-His(Isobut): Nach 30 Min. ist noch jeweils etwa die Hälfte Histidin und His(Z-NO₂) vorhanden.

Der Im-Z-Rest im Z-His(Z) dürfte sich ähnlich verhalten wie beim Boc-His(Z), der Z(OMe)-Rest wie der Boc-Rest, beide wurden noch nicht untersucht. Der Dnp-Rest ist unter sauren und alkalischen Bedingungen (Triäthylamin) stabil [86]. Die Abspaltung dieser Gruppe erfolgt gewöhnlich mit SH-Verbindungen [91]. Auch eine Behandlung mit Hydrazin übersteht der Dnp-Rest nicht. Die Hydrazinolyse-Ansätze His(Dnp)-haltiger Peptide werden tiefrot.

3.3. Dorman-Titration Histidin-haltiger Peptide

Da die Imidazol-Schutzgruppen wie oben gezeigt durch die verschiedenen Reagenzien verschiedenartig und unterschiedlich schnell angegriffen werden und da Pyridinhydrochlorid selbst schon einen teilweisen Abbau hervorruft, ist die Dorman-Titration für Histidin-Derivate bei der Merrifield-Synthese nicht brauchbar. Damit fällt auch die Umsatzkontrolle nach diesem Verfahren für alle Synthesen weg, sobald Histidin in die Peptidkette eingebaut worden ist. Auch bei der Verwendung völlig stabiler imidazolgeschützter Histidin-Derivate wie z.B. beim His(Bzl) ist die Titration nicht mehr möglich, da diese Derivate noch basisch genug sind, um durch Pyridinhydrochlorid wenigstens teilweise protoniert zu werden.

3.4. Schlußfolgerungen

Aus den vorliegenden Versuchen ergibt sich:

Das bisher am meisten verwendete Boc-His und das Boc-His(Z) geben die schlechtesten Kupplungsausbeuten. Beim Boc-His hängt das primär wahrscheinlich mit der schlechten Löslichkeit zusammen. Verwendet man für die Synthese ein öliges, nicht ganz sauberes, dafür aber besser lösliches Material, so können die Ausbeuten besser werden, aber selbst wenn sie dadurch verdoppelt werden, zählt Boc-His immer noch zu den Histidin-Derivaten mit den schlechtesten Kupplungsausbeuten.

Die reproduzierbar schlechte Umsetzung von Boc-His(Z) und Boc-His(Isobut) ist unklar. Rein spekulativ könnte man vielleicht an eine Übertragung der Imidazol-Schutzgruppen auf Aminogruppen denken, ähnlich wie es bei der Reaktion mit Benzylamin geschehen ist. Dem widerspricht jedoch der 100 %ige Umsatz der jeweiligen p-Nitrophenylester. Die Verhältnisse bei den p-Nitrophenylestern lassen sich jedoch schlecht auf einfache Weise untersuchen, weil dabei die Benzylaminolyse des aktiven Esters mit zu berücksichtigen ist.

Da jedoch auch das Boc-His(Boc) nur zu 88 % reagiert und hierbei eine Imidazolid-Spaltung auszuschließen ist, können auch noch andere Gründe maßgebend sein. Sowohl Boc-His(Boc) als auch Boc-His(Z) und Boc-His(Isobut) sind ölig-schaumig und deshalb schwer zu reinigen, schlecht zu trocknen und einzuwiegen.

Mit den am Ende der Tab. 1 stehenden Derivaten werden Kuppungsausbeuten von 100 % erreicht. Von diesen ist das Boc-His(Bzl) wegen der Abspaltungsbedingungen für den Benzylrest (s.o.) nicht zu empfehlen. Dagegen kann das Boc-His(Boc)-ONp ohne Einschränkung empfohlen werden. Beim Boc-His(Z)-ONp sollte noch die Abspaltung des Z-Restes unter alkalischen Bedingungen genauer untersucht werden.

Das Adoc-His(Adoc) kann nur verwendet werden, wenn zur Abspaltung TFA verwendet wird, da mit HCl/Eisessig keine quantitative Abspaltung erfolgt.

Für das Boc-His(Isobut) gilt dasselbe wie für das Boc-His(Z)-ONp. Die restlichen His-Derivate (über 100 %-Werte) sind sowohl von der Synthese her als auch wegen der offensichtlichen Schwierigkeiten beim quantitativen Auswaschen, nicht zu empfehlen (Aromaten-Wechselwirkung mit dem Harz?).

Die Boc-His(Boc)-ONp hat gegenüber allen anderen urethanartigen Imidazolschutzgruppen noch den Vorteil, daß bei seiner Acidolyse gasförmige Folgeprodukte entstehen (Isobutylen und CO_2), während bei den anderen Schutzgruppen die intermediär auftretenden Kationen zu Nebenreaktionen Anlaß geben könnten. So ist zum Beispiel für das Tyr(Bzl) nachgewiesen worden, daß diese Schutzgruppe - anders als bisher angenommen - für die Merrifield-Synthese ungeeignet ist, weil der Benzyläther bei der sauren Behandlung erstens nicht ausreichend stabil ist und zweitens das bei der Abspaltung entstehende Benzylkation den Tyrosin-Rest in 3-Stellung selbst benzyliert [91]. In diesem Fall hat auch die Zugabe von Kationenfängern keinen

Einfluß, es handelt sich offensichtlich um eine intramolekulare Reaktion.

Das freie Boc-His(Boc), das nach den hier gemachten Erfahrungen dem Boc-His(Boc)-ONp unterlegen ist, wurde inzwischen von LI für die Merrifield-Synthese des menschlichen ACTH's (39 Aminosäuren) und die Synthese des β -Melanotropins des Menschen (22 AS) und des Affen (18 AS) herangezogen [94].

Alle Derivate außer His(Bzl) und His(Dnp) gewährleisten keinen dauerhaften Schutz des Imidazolrestes im Verlauf der Synthese. Das ist jedoch für die Merrifield-Synthese wahrscheinlich ohne Belang. Acylierungen des Imidazolkerns durch Boc-Aminosäuren mittels DCCI sind unwahrscheinlich bzw. die Produkte sind so reaktiv, daß sie entweder selbst als Acylierungsreagenzien wirken, auf keinen Fall aber eine acidolytische Behandlung überstehen werden. Experimentelle Befunde dazu liegen allerdings bis jetzt nicht vor.

4. Untersuchungen über die Eignung verschiedener Lysin-Derivate für die Merrifield-Synthese

Für den zufriedenstellenden Verlauf der Synthese eines längeren lysinhaltigen Peptids nach der Festphasenmethode ist eine stabile ϵ -Aminoschutzgruppe Voraussetzung. Das gilt besonders dann, wenn sich das Lysin in der carboxylendständigen Region befindet, was bei dem vorliegenden Peptid der Fall ist. Auf die mangelnde Stabilität der ϵ -Z-Gruppierung hat zuerst SCHLOSSMAN [95] 1968 hingewiesen, während andere Autoren dieser Ansicht widersprochen haben [18]. Nach den sehr schlechten Ergebnissen der Merrifield-Synthese mit ϵ -Z-Lysin und der im Vergleich dazu recht guten Aminosäure-Analyse des Produkts, das erhalten wurde, nachdem das carboxylendständige Lysin durch Glycin ersetzt wurde (s.S.32), erschien es geboten, die Stabilität der ϵ -Z-Gruppe näher zu untersuchen und mit

anderen Schutzgruppen zu vergleichen.

Als erster hat SCHNABEL [96] die Stabilität verschiedener Lysin-Derivate gegenüber TFA und HCl/Eisessig in Lösung untersucht, und in neuester Zeit ist von MERRIFIELD [92] und von LI [97] ebenfalls auf die unzureichende Stabilität der ϵ -Z-Gruppe hingewiesen worden. Auch die beiden letzteren Autoren haben ihre Untersuchungen in Lösung durchgeführt.

In unseren Experimenten wurde dagegen die Stabilität einiger Lysin-Derivate nach Kupplung an das unter 3. erwähnte Gly-Gly-Ala-Harz getestet und geprüft, in welchem Ausmaß es zu einer Acylierung der eventuell freigesetzten ϵ -Aminogruppe des Lysins durch die folgende Aminosäure, in unserem Versuch Phenylalanin, kommt.

Die in Tab. 2 aufgeführten Lysin-Derivate wurden wie beim Histidin in 5-fachem Überschuß bei 3 Stunden Reaktionszeit gekuppelt. Danach wurde 1/2 Std., 2 Std. und 12 Std. mit HCl/Eisessig behandelt und die Gesamtmenge der freien Aminogruppen durch Dorman-Titration bestimmt. Dabei zeigte sich, daß es nach 2 und 12-stündiger Behandlung mit HCl/Eisessig, was 4 bzw. 24 Kupplungszyklen entspricht, zu einem Verlust an Peptid durch Abspaltung vom Harz kommt. Da die Abspaltung des Peptids vom Harz und die Freisetzung der ϵ -Aminogruppe sich auf die Ergebnisse der Dorman-Titration gegenläufig auswirken, lassen sich die Titrationsergebnisse ohne quantitative Bestimmung des verlorengegangenen Peptids nicht eindeutig interpretieren. Eine solche quantitative Bestimmung des Verlustes an Peptid durch Abspaltung vom Harz wurde mit Phe-Gly-Gly-Ala-Harz durchgeführt. Dabei wurde gefunden, daß nach 2-stündiger ununterbrochener Behandlung des Peptidharzes mit HCl/Eisessig etwa 25 %, nach 12 Stunden ca. 40 % der Gesamtmenge an freien Aminogruppen verloren gingen. Unter der begründeten Annahme, daß die Abspaltungsrate beim Lys-Gly-Gly-Ala-Harz etwa in derselben Höhe liegt wie beim Phe-Gly-Ala-Ala-Harz, ergaben sich für die Abspaltung der ϵ -Aminoschutz-

gruppen nach 12 Stunden HCl/Eisessig-Einwirkung folgende Ergebnisse:

Tabelle 2 : Abspaltung der ϵ -Aminoschutzgruppe bei verschiedenen Lysin-Derivaten in Prozent, 12 Std. HCl/HAc, lt. Dorman-Titration

Lys-Derivat	Abspaltung %	Lys-Derivat	Abspaltung %
ϵ -Z-NO ₂ [96]	0	ϵ -Z(mCl) [96]	20
ϵ -Dipmoc [98]	0	ϵ -Z(pCl) [96]	25
ϵ -Pht [98,100]*	0	ϵ -Z [101, 87]	30

*) Kupplung nur 80 %

Während der ϵ -p-Nitrocarboboxy- und der ϵ -Diisopropylmethyloxycarbonyl- sowie der Phthalyl-Rest nicht meßbar abgespalten werden, beobachtete man beim Z-Rest eine Abspaltung von 30 %; die Einführung eines Chlorsubstituenten in p- oder m-Stellung bringt keine wesentlichen Vorteile.

Um die aus der Dorman-Titration erkennbare Abspaltung des ϵ -Z-Restes auch direkt über eine Aminosäure-Analyse verfolgen zu können, wurde nach Behandlung des Boc-Lys(Z)-Gly-Gly-Ala-Harzes mit HCl/Eisessig eine Kupplung mit Boc-Phe durchgeführt, der Boc-Rest abgespalten und die Ergebnisse der Dorman-Titration durch eine Aminosäureanalyse kontrolliert. Das Ergebnis der Aminosäureanalyse (Phe 1,18; Lys 0,94; Gly 2,00; Ala 1,00) zeigt, daß etwa 25 % der ϵ -Z-Gruppe nach 12 Stunden abgespalten sind und mit Phe gekuppelt haben. Als grobe Faustregel ergibt sich daraus, daß man pro Kupplungs-cyclus bei Verwendung des Z-Restes als ϵ -Aminoschutzgruppe mit einer Abspaltung von 1 % rechnen kann.

Außerdem läßt sich aus den Ergebnissen die Empfehlung ableiten, daß man den Z(NO₂)-Rest als ϵ -Aminoschutzgruppe verwenden sollte, falls man zur Freisetzung des Peptids hydrieren

kann (HF und HBr/TFA greifen ihn nicht an), daß man den Diisopropyl-methyloxycarbonyl-Rest verwenden sollte, falls man mit flüssigem HF behandeln kann.

Die schon erwähnten Arbeiten von SCHNABEL [96], MERRIFIELD [92] und LI [97] kommen im wesentlichen zu denselben Aussagen mit der Einschränkung, daß MERRIFIELD die Stabilität des Lys(mClZ) höher einschätzt als sie hier gefunden wurde, aber auch nicht für ausreichend befunden hat. MERRIFIELD empfiehlt als geeignete Schutzgruppe die 2,4-Dichlorcarbobenzoxy-Gruppe während LI der o-Bromcarbobenzoxygruppe den Vorzug gibt.

Zum Schluß dieses Abschnittes sei noch auf ein bis jetzt nicht ganz geklärtes Phänomen hingewiesen:

Setzt man bei den geschilderten Versuchen Lysin-Derivate ein, die an beiden Aminogruppen säurelabile Reste tragen, so erhält man nach Behandlung mit HCl/Eisessig Dorman-Titrationswerte, die keineswegs dem aus der Aminosäureanalyse ersichtlichen Kupplungsgrad entsprechen, also maximal doppelt so hoch sind wie die Beladung, sondern nur eine Erhöhung um etwa 10 bis 15 %. Die Aminosäureanalyse nach Kupplung mit Boc-Phe zeigt jedoch, daß beide Aminogruppen acyliert worden sind, wenn auch nicht quantitativ. So wurde z.B. das Peptid Boc-Lys(Boc)-Gly-Gly-Harz nach HCl/Eisessig-Behandlung mit Boc-Phe umgesetzt und folgende AS-Analyse erhalten: Phe 1,24; Lys 0,74; Gly 2,00; Ala 1,00. Der Dorman-Wert ist nach halbstündiger Behandlung mit HCl/Eisessig von 0,475 mMol auf 0,560 mMol angestiegen statt auf 0,826 mMol wie bei 74 % Kupplungsausbeute des Lysins zu erwarten wäre.

Geht man von Bpoc-Lys(Boc)-Gly-Gly-Ala-Harz aus, deblockiert und setzt mit Boc-Phe um, so erhält man bei der Aminosäureanalyse Phe 1,19; Lys 0,83; Gly 2,00 und Ala 1,04. Der Dorman-Wert stieg jedoch nur von 0,485 mMol auf 0,525 mMol und nicht auf 0,885 mMol wie bei 83 % Kupplungsausbeute zu erwarten gewesen wäre.

Da unwahrscheinlich ist, daß beide Schutzgruppen nicht quantitativ abgespalten werden, muß man annehmen, daß die übliche Behandlung mit Triäthylamin in Methylenchlorid nicht geeignet ist, die ϵ -Aminogruppe des Lysins vollständig zu deprotonieren.

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. Verlauf der Synthesen nach Merrifield an einem Stück

5.1.1. Synthese unter Verwendung von Boc-His

Die Synthese der gesamten Partialsequenz 1-27 wurde gestartet mit 3 g Harz entsprechend einer Gesamtbeladung von 2,83 mMol Lys(Z) nach Dorman-Titration und einem Chlorid-Leerwert von 0,040 mMol. Alle Aminosäurederivate wurden in 5-fachem Überschuß eingesetzt, ebenso DCCI, Reaktionszeit war 3 Stunden. Die Kupplungsausbeuten lagen zunächst > 98 %, bei der Verknüpfung von Boc-Thr(Bzl) 22 mit Ala 23 sank die Schrittausbeute auf 85 %, nach der anschließenden Kupplung von Boc-Ala 21 an das Threonin 22 waren noch 10 % freie Aminogruppen nachzuweisen, nach Boc-Thr 20 wieder 14 %. Gleichzeitig war die Gesamtmenge der freien Aminogruppen von ursprünglich 2,83 mMol Aminogruppen auf 2,50 mMol gefallen. Die Kupplung des Boc-His 16 mit dem Peptidpolymer gelang nur noch mit sehr geringer Ausbeute: Vor Abspaltung der Boc-Gruppe ließen sich 0,689 mMol Aminogruppen nachweisen, bei vollständigem Umsatz und vollständiger Protonisierung des Imidazolkerns hätten es 2,5 mMol sein müssen. Nach Behandlung mit HCl/Eisessig war die Gesamtmenge der freien Aminogruppen 2,48 mMol statt - vollständigen Umsatz und vollständige Protonisierung des Imidazolrestes vorausgesetzt - 5 mMol.

Der Grund für diesen schlechten Umsatz lag auf der Hand: reines kristallines Boc-His ist nur in heißem DMF löslich. Aus dieser Lösung fällt das Derivat nach Überführung ins Reaktionsgefäß und Abkühlung auf Zimmertemperatur wieder fast vollständig aus. Die Synthese mußte deshalb an dieser Stelle abgebrochen werden, um zunächst neue Histidin-Derivate zu synthetisieren und zu erproben (s.S.16).

5.1.2. Synthese unter Verwendung von Boc-His(Boc)-ONp

Nachdem es gelungen war, Boc-His(Boc)-ONp darzustellen, konnte eine neue Synthese gestartet werden. Man ging aus von 5 g Boc-Lys(Z)-Harz mit einer Gesamtbeladung von 4,47 mMol Aminosäure ($\pm 0,9$ mMol/g) und arbeitete mit 5-fachem Überschuß. Der Chlorid-Leerwert betrug 0,009 mMol. Dieser niedrige Wert wurde erreicht durch Steigerung der Veresterungszeit von den üblichen 24 auf 72 Stunden. Um die Synthesezeit nicht zu sehr zu verlängern, wurde auf eine Umsatzkontrolle nach jedem Schritt verzichtet, lediglich die Gesamtmenge freier Amino-
gruppen wurde jeweils bestimmt. Dabei war nach Einbau des Histidins an die schon diskutierten Unsicherheiten bei der Dorman-Titration zu denken. Außer Histidin wurden alle Aminosäuren wie unter 5.1.1. eingesetzt.

Der Startwert von 4,47 mMol änderte sich bis zum Valin 18 nicht (4,45 mMol), stieg nach Cystein 17 etwas an (4,90 mMol) und erreichte nach Histidin 16 den Wert 7,40 mMol, stieg dann an auf 9,07 mMol nach Glycin 10 und fiel bis zum Ende der Synthese dann kontinuierlich auf 6,8 mMol.

Nach Abschluß der Synthese wog das getrocknete Harz 15,6 g, das bedeutete eine Gewichtszunahme von 10,6 g $\pm$ 66 %. Bei der Abspaltung vom Harz mit HBr/Trifluoressigsäure in Gegenwart von Anisol erhielt man 1,5 g S-p-Methoxybenzyl-geschütztes Peptidtrihydrobromid. Das bedeutete eine Rohausbeute von nur 12 % bezogen auf Lysin am Harz. Wie die Aminosäureanalyse (Tab. 3) zeigte, erhielt man ein völlig unbrauchbares Produkt, bei dem sich ein weiterer Arbeitsaufwand zur Reinigung nicht lohnte.

5.1.3. Synthese unter Einsatz des Blockers β -Sulfopropionsäureanhydrid

Diese Synthese ging aus von 2,8 g Boc-Lys(Z)-Harz, d.h. von

2,5 mMol Lysin. Das eingesetzte His-Derivat war wieder das Boc-His(Boc)-ONp. Die Anwendung des Blockers geschah so, daß nach Kupplung einer Boc-geschützten Aminosäure und Auswaschen des Harzes mit DMF die nicht umgesetzten Aminogruppen durch einstündiges Behandeln mit einer Lösung von β -Sulfopropionsäureanhydrid in DMF (10 % Überschuß berechnet auf Gesamt-NH₂) mit N-Methylmorpholin als Base verschlossen wurden. Der überschüssige Blocker wurde durch sorgfältiges Waschen mit DMF entfernt und nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe der übliche Cyclus fortgesetzt. Ein Cyclus dauerte etwa 5 Stunden, sodaß man pro Tag nur zwei Aminosäuren ankuppeln konnte.

Die Gewichtszunahme des Harzes nach Ende der Synthese betrug 4,5 g $\hat{=}$ 52 % des theoretischen Wertes. Die Abspaltung des Peptids erfolgte wieder mit HBr/Trifluoressigsäure und Anisol-Zusatz, dabei wurden 1,5 g Rohprodukt erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 18 % bezogen auf die erste Aminosäure. Im Vergleich zu den gewöhnlich erhaltenen Ausbeuten von ca. 60 % ist dieses Ergebnis sehr schlecht.

500 mg des Rohproduktes wurden zur Abtrennung der durch den Blocker stark sauren Rumpfsequenzen über den bas. Austauscher Amberlite IR-45 in Acetatform filtriert. Das Elutionsdiagramm ergab einen sehr scharfen Peak. Aus 60 ml Lösung wurden 100 mg eines amorphen, schwach gelben Pulvers isoliert, d.h. es wurden nur 20 % des auf die Säule gegebenen Rohproduktes zurückgewonnen. Bei Elution mit 0,1 N HCl erhielt man einen breiten zweiten Peak, aus dem noch etwa 20 mg Substanz isoliert wurden. Dieses Material wurde nicht näher untersucht. Die Ausbeute an Endprodukt in Bezug auf die erste Aminosäure des Harzes betrug nach Filtration über den bas. Ionenaustauscher noch 3,6 %. Die Aminosäureanalyse (Tab. 3) beweist, daß auch dieses Produkt völlig unbrauchbar ist.

5.1.4. Synthese der Gesamtsequenz mit carboxylendständigem Glycin anstelle von Lysin

Nachdem deutlich geworden war, daß die Z-Gruppe für eine wiederholte acidolytische Behandlung nicht widerstandsfähig genug ist (s.S. 26), wurde noch eine Peptidkette synthetisiert, bei der Lysin 27 durch Glycin ersetzt wurde. Zu diesem Zeitpunkt waren der Dipmoc-, der Z(OBr)- und der Z(2,4-diCl)-Rest noch nicht bekannt und geprüft.

Die Synthese ging aus von 3 g Harz $\hat{=}$ 1,875 mMol Glycin (0,61 mMol/g Harz) und wurde nach der üblichen Methode (3 Std. Reaktionszeit für DCCI-Kupplungen, 15 Std. für p-Nitrophenylester) durchgeführt. Die Umsatzkontrolle nach Dorman wurde bis zum Einsatz von Boc-His(Boc)-ONp durchgeführt. Dabei zeigte sich wieder, daß Thr 22 auf Ala 23 nur mit 86 % kuppelt. Der Dorman-Wert nach der anschließenden Kupplung von Alanin 21 stieg wieder so, daß die Hälfte der vom Threonin nicht erfaßten Aminogruppen jetzt reagiert haben könnte. Nach Threonin 20 waren insgesamt 11 % der Aminogruppen frei, nach Alanin 19 wieder nur noch 5 %.

Die Abspaltung vom Harz mit HBr/TFA in Gegenwart von Anisol lieferte eine Rohausbeute von 2,8 g, das entspricht 66 % der theoretisch zu erwartenden Menge. Die Aminosäureanalyse dieses rohen Produktes (Tab. 3) ist relativ gut, nur die Werte für die zuletzt gekuppelten Reste sind etwas erniedrigt (Prolin, Lysin). Auch der Valin-Wert ist zu niedrig, wobei die Vermutung nahe liegt, daß dafür schlecht gekuppeltes Valin 1 verantwortlich ist.

Tabelle 3 : Aminosäureanalysen der nach Merrifield synthetisierten Gesamtsequenz

		normale Synthese	Synthese mit Blocker	Synthese mit C-terminalem Gly statt Lys
	ber.	gef.	gef.	gef.
Ala	5	5,00	5,00	5,00
Cys	1	n.b.	n.b.	n.b.
Glu	4	2,80	2,82	3,86
Gly	3(4)	2,61	1,44	4,00
His	1	0,77	0,40	0,91
Ile	1	1,05	0,92	1,18
Lys	2(1)	1,20	2,02	0,81
Met	1	0,69	1,16	0,86
Phe	1	0,33	0,51	1,00
Pro	1	1,21	0,39	0,88
Ser	1	0	0,15	0,99
Thr	3	1,90	2,45	2,96
Val	3	2,02	2,16	2,52
NH ₃	3	2,35	n.b.	2,80

Versuche, dieses Produkt mit Hilfe präparativer Disk-Elektrophorese (Ultraphor-Gerät der Fa. Colora) zu reinigen, sind aus technischen Gründen nicht gelungen. Die Trennung von Peptiden verlangt eine relativ hohe Vernetzung (7,5 % wurden versucht). Dabei traten immer wieder Risse im Gel und in der Dialysemembran auf, die eine Trennung unmöglich machten. Im analytischen Lauf zeigten sich eine Hauptbande und zwei Nebenbanden, jeweils mit Schwanzbildung. (Abb. 4-6)

Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliantblau R 250 (Merck). In wie weit damit aber kleinere Peptide erfaßt werden können ist unklar.

Eine Anfärbung mit Pauly-Reagenz oder Chlor-Tolidin gelingt nicht, weil diese Reagenzien nicht fixierend wirken.

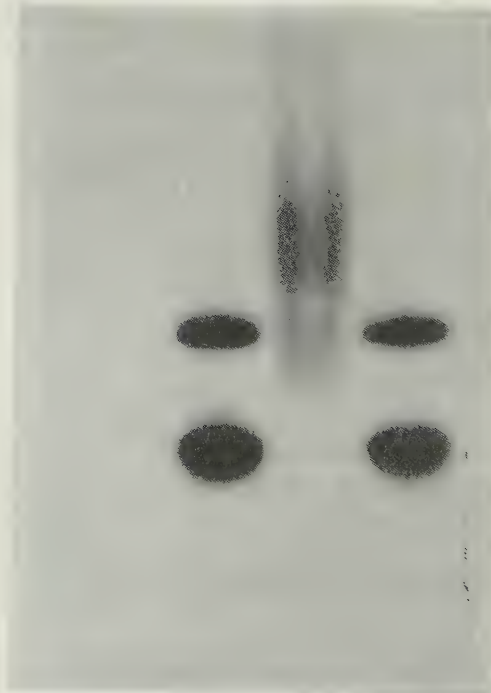
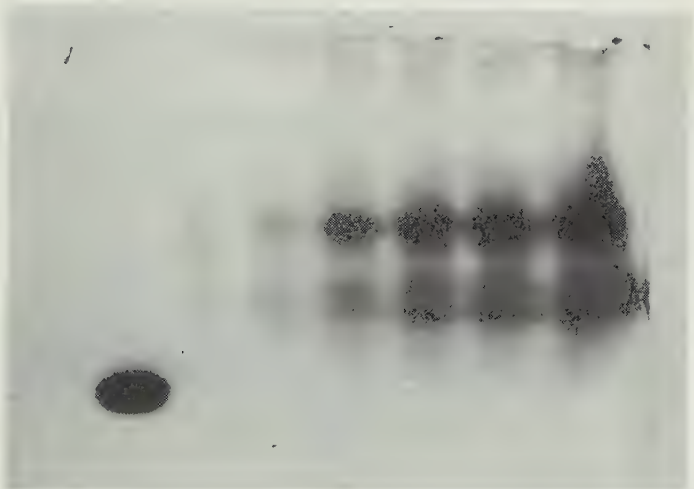


Abb. 4 : Disk-Elektropherogramm des
Peptids 1-27 (Synthese 5.1.2)
Testprotein: Lysozym und
Chymotrypsinogen (oben)



Abb. 5 und 6 :
Disk-Elektropherogramm
des Peptids 1-27 mit
Glycin anstelle von
Lysin 27
(Synthese 5.1.4)
Testprotein: Lysozym



5.2. Verlauf der Synthese von Peptidhydraziden nach der Merrifield-Methode

Die Synthese der oben aufgeführten 5 Fragmente erfolgte nach den schon beschriebenen Verfahren, jedoch ging man von jeweils höher beladenen Harzen aus (1,2 mMol/g). Die Ansätze waren jedoch nicht größer als 5 g Harz insgesamt. Damit sollte bei einer Synthese etwa 2-3 g Peptidhydrazid erhalten werden. Die Hydrazinolyse der Peptide 1-4, 5-10, 11-15, 12-21 wurde mit 10-fachem Überschuß an Hydrazinhydrat in DMF (50 ml/g Harz) in 3 Tagen durchgeführt. Die Aminolyse des Peptids 22-27 erfolgte mit DMF/fl. NH_3 im geschlossenen Gefäß ebenfalls 3 Tage lang.

Für die einzelnen Fragmente ergaben sich folgende Ergebnisse:

Fragment I : Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly- N_2H_3

Aminosäureanalyse:

	Val	Lys	Pro	Gly
ber.	1	1	1	1
gef.	0,90	0,82	0,98	<u>1,00</u>

In 35 %iger Ausbeute bezogen auf Glycin wurde ein Sirup erhalten; chromatographisch stark verunreinigt und nicht kristallisierbar.

Fragment II : Z-Glu(OBut)-Gln-Ser(OBzl)-Phe-Val-Gly- N_2H_3

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ser	Phe	Val	Gly
ber.	2	1	1	1	1
gef.	1,61	0,80	0,98	0,99	<u>1,00</u>

Die Ausbeute betrug 25 %, bezogen auf Glycin. Das Peptidhydrazid ist ebenfalls nicht chromatographisch rein und ließ sich durch Umkristallisation nicht weiter reinigen.

Fragment III : Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-N₂H₃

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ala	Thr	Gly
ber.	1	2	1	1
gef.	0,89	1,88	0,80	<u>1,00</u>

Die Ausbeute betrug nur 15 %, bezogen auf Glycin.

Das Hydrazid ist chromatographisch nicht einheitlich. Eine Verunreinigung mit Hydrazinhydrochlorid (aus nicht umgesetzten Chlormethyl-Gruppen des Harzes) ist nicht durch Wasser auszuwaschen, da hierbei auch das Peptid in Lösung geht.

Fragment IV : Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-N₂H₃

Aminosäureanalyse:

	His	Cys	Val	Ala	Thr
ber.	1	1	1	2	1
gef.	0,64	n.b.	1,05	<u>2,00</u>	0,85

Das Peptid ist chromatographisch nicht einheitlich, die Ausbeute auf Alanin bezogen betrug 8 %.

Setzt man an Stelle von Boc-His(Boc)-ONp Boc-His(Dnp) ein, so erhält man nach der Hydrazinolyse kein festes Produkt, sondern nur ein dunkelrotes Öl. }

Fragment V : Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ala	Gln	Ile	Met	Lys
ber.	1	1	1	1	1	1
gef.	0,89	<u>1,00</u>	0,93	1,00	0,65	0,94

Das Amid wurde in einer Ausbeute von 10 % bezogen auf Lysin erhalten, es war chromatographisch nicht einheitlich; die Kupplung von Thr auf Ala betrug nach Dorman-Titration nur 90 %. Eine Wiederholung der Kupplung steigerte den Wert auf 93 %. Das Amid ist sehr schwer löslich in DMF.

Nach den unbefriedigenden analytischen Daten und den schlechten Ausbeuten wurde weder eine Reinigung noch eine Verknüpfung der erhaltenen Merrifield-Produkte durchgeführt.

Wie bei den klassischen Synthesen festgestellt wurde, sind außer Fragment V alle Fragmente sehr schwer in DMF löslich. Das ist wahrscheinlich ein wesentlicher Grund für die schlechten Ausbeuten bei der Abspaltung vom Harz. Geht man davon aus, daß Hydrazide und Amide aus Fehl- oder Rumpfsequenzen leichter löslich sind als die gewünschten Produkte, so kann es bei der Hydrazinolyse oder Aminolyse zu einer Verschiebung des ursprünglichen Verhältnisses reines Produkt/Nebenprodukt kommen, d.h. zu einer rel. Anreicherung von Nebenprodukten.

5.3. Klassische Synthesen der Teilsequenzen

5.3.1. Sequenz 22-27 (Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys-NH₂)

Das geschützte Hexapeptidamid wurde sowohl schrittweise vom Carboxylende als auch aus einem Tetrapeptid 22-25 und einem Dipeptid 26-27 aufgebaut.

Das Dipeptid 26-27 ließ sich mit guter Ausbeute aus Boc-Met-DCHA-Salz und Lys(Z)-OCH₃ x HCl mit DCCI kuppeln, und zwar ohne Freisetzung von Boc-Met aus dem DCHA-Salz. Bei Verwendung von Boc-Met-ONp waren die Ausbeuten wesentlich schlechter. Die Aminolyse zum gesch. Dipeptidamid mit methanol. Ammoniak verlief ohne Komplikationen. Das Auftreten des Sulfid-Derivates konnte nicht beobachtet werden. Bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit reiner TFA oder Methylenchlorid/TFA (1:1) (30 Min.) trat ein stark hydrophiles Nebenprodukt auf - offensichtlich das decarbobenzoxylierte Produkt. Nach den Stabilitätsuntersuchungen von Lysin-Derivaten bei der Merrifield-Synthese war das nicht verwunderlich. Zu dieser Zeit erschien die bereits zitierte Arbeit von SCHNABEL [96],

der ebenfalls über nicht 100 %ige Stabilität der Z-Gruppe unter den üblichen Bedingungen der Boc-Abspaltung berichtete und die Anwendung wässriger TFA vorschlug. Für die Deblockierung der α -Aminogruppe bewährte sich dieses Reagenz bei völliger Erhaltung des ϵ -Z-Schutzes. Voraussetzung für die Anwendung ist allerdings die Abwesenheit von Benzylestern; diese werden ebenfalls gespalten. Die Anknüpfung des Boc-Ile an das Dipeptidamid 26-27 mit DCCI-Hydroxybenztriazol nach KÖNIG und GEIGER [70] sowie die Deblockierung mit wässriger TFA verliefen gut.

Das Tetrapeptidderivat 24-27 wurde günstiger über Boc-Gln-ONp als über Boc-Gln/DCCI/HOBt dargestellt, da das geschützte Peptid bei der Synthese in DMF ausfällt und die Abtrennung von DC-Harnstoff dann schwierig ist. Das Tetrapeptid-Derivat ist nur noch in heißem DMF, heißem HMPT oder kochendem Pyridin löslich. Die Hoffnung, die Löslichkeit durch Verwendung von Boc-Gln(Pmb) zu verbessern, erwies sich als trügerisch: das Peptid fällt bei der Synthese in DMF ebenso zusammen mit DC-Harnstoff aus, ist genauso schwer löslich und läßt sich auch durch Auskochen mit Isopropanol nur schwer vollständig von DC-Harnstoff befreien, da es quillt und sich schlecht absaugen läßt.

Die Chromatographie des deblockierten Tetrapeptid-Trifluoracetats Gln-Ile-Met-Lys-NH₂ lieferte keinen Hinweis auf Pyroglutaminsäure-Bildung. Wegen der besseren Abtrennung der Nebenprodukte war auch anschließend die Verwendung von Boc-Ala-ONp zum Pentapeptidamid der DCCI-Methode vorzuziehen, zumal auch dieses Peptid-Derivat sehr schwer löslich ist. Durch Auskochen mit Methanol und Umfällen aus heißem DMF mit Methanol ließ sich p-Nitrophenol und nicht umgesetzte Carboxylkomponente entfernen. Die anschließende Kupplung von Boc-Thr mit dem Pentapeptid-Trifluoracetat 23-27 mit DCCI/HOBt lieferte nach wiederholtem Auskochen (bei der Synthese in DMF fielen wieder DC-Harnstoff und Peptid zusammen aus) ein fast völlig unlösliches Produkt. Auch das teilgeschützte

Hexapeptidamid-Trifluoracetat ist nur noch in heißem HMPT löslich, fällt allerdings beim Abkühlen und Mischen mit der gleichen Menge DMF nicht wieder aus. Wegen der Schwerlöslichkeit der Sequenzen 24-27, 23-27 und 22-27 und wegen der schlechten Absaugbarkeit der jeweiligen Produkte wurde noch die Sequenz 22-25 schrittweise - ausgehend von Ile-ONB x Tos- aufgebaut und nach Abhydrieren des p-Nitrobenzylesters mittels DCCI/HOBt mit dem Dipeptidamid-Trifluoracetat 26-27 gekuppelt. Man erhielt dasselbe schwer lösliche Endprodukt wie oben, jedoch mit einem etwas höheren Drehwert.

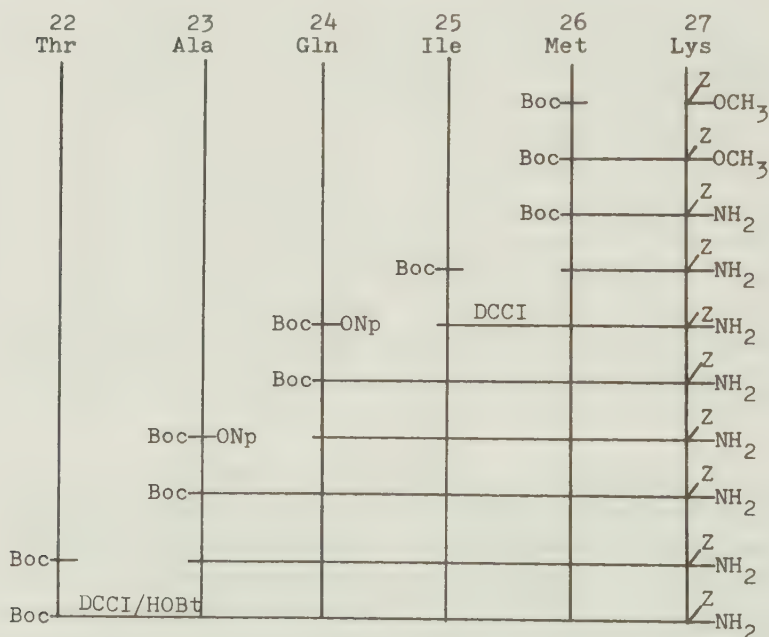


Abb. 7 : Synthese-Schema Sequenz 22-27

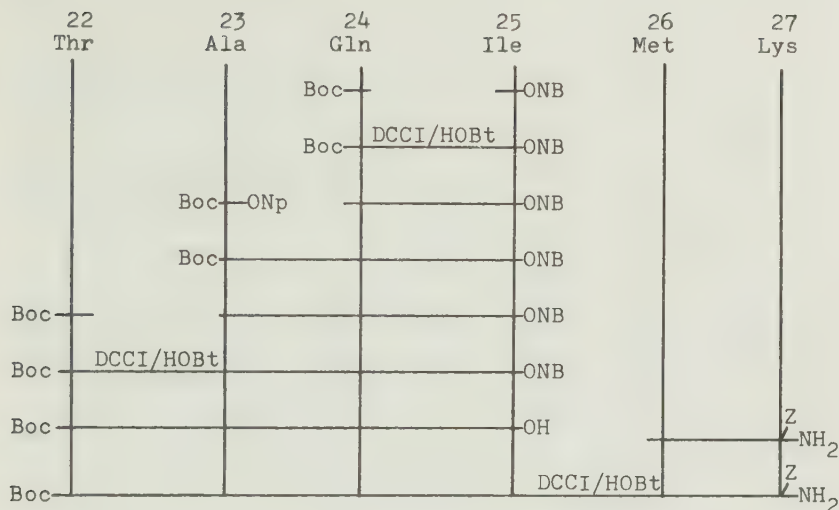


Abb. 8 : Synthese-Schema Sequenz 22-27
(zweiter Weg)

5.3.2. Sequenz 16-21 (His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala)

Diese Sequenz wurde zunächst von Ala-OMe x HCl ausgehend schrittweise aufgebaut (Z-Thr-DCCI/HOBt; Z-Ala-ONp; Z-Val-ONp)*. Bereits das geschützte Tetrapeptid war nur noch in kochendem DMF löslich, ließ sich jedoch in Methanol/Eisessig von der Z-Schutzgruppe befreien, da der freie Peptidester in Methanol/Eisessig löslich ist. Die anschließende Umsetzung mit Boc-Cys(MBzl)-ONp verlief reibungslos. Allerdings ist das erhaltene geschützte Pentapeptid 16-21 sehr schwer löslich, während das entsprechende Peptidtrifluoracetat aus Äthanol

*) Die hydrogenolytische Abspaltung des Z-Restes auf der Dipeptidstufe war etwas kritisch, als Nebenprodukt konnte hier Cyclo-Thr-Ala isoliert werden.

umkristallisierbar ist. Während der Behandlung mit TFA färbte sich die Lösung blaßrot. Im unkristallisierten freien Peptid läßt sich jedoch mit Nitroprussid-Natrium kein freies SH nachweisen. Die anschließende Anknüpfung des Histidins geschah auf drei Arten: über Boc-His-Azid, Boc-His(Boc)-ONp sowie Boc-His(Tos)-ONp. Nur die Azidsynthese lieferte ein einheitliches Produkt, während bei den beiden anderen Verknüpfungsmethoden die Imidazolschutzgruppe während der Synthese bzw. Aufarbeitung z.T. abgespalten wurde. Es ist noch nicht geklärt, bei welchem Schritt das geschah. Für dieses Peptid erwies sich das jedoch als kein schwerwiegender Nachteil, da bei der anschließenden Hydrazinolyse aus allen drei genannten Peptiden dasselbe imidazolungeschützte Peptidhydrazid erhalten wurde. Die Umsetzung mit Boc-His(Dnp) (DCCI/HOBt) bereitete keine Schwierigkeiten, wenn man davon absieht, daß auch dieses Peptid sehr schwer löslich ist. Allerdings führt die hydrazinolytische Abspaltung des Dnp-Restes zu einer tief rotbraunen Färbung des Ansatzes, aus dem aber im Gegensatz zum entsprechenden Merrifield-Produkt das Hydrazid ohne Schwierigkeiten zu isolieren ist. Die Hydrazinolyse des geschützten Hexapeptidesters in DMF liefert ein nur noch in heißem HMPT lösliches Hydrazid, das in den übrigen Lösungsmitteln, besonders in DMF und Methanol, nur quillt und dann nicht mehr absaugbar und nur schlecht zentrifugierbar ist.

Anstelle des Boc-Cys(MBzl)-ONp wurde auch eine Kupplung von Boc-Cys(SET) mittels DCCI/HOBt an den Tetrapeptidmethylester unternommen. Der resultierende geschützte Pentapeptidester war jedoch genauso schwerlöslich wie das entsprechende S-p-Methoxybenzylderivat. Außerdem stellte sich heraus, daß diese Schutzgruppe gegen Hydrazinolyse nicht ausreichend beständig ist [102].

Eine parallel laufende Synthese, ausgehend von Ala-ONB x HBr und schrittweiser Ankondensation von Boc-Thr (DCCI/HOBt), Boc-Ala-ONp und Boc-Val (DCCI/HOBt), führte zwar zu einem wesentlich besser löslichen geschützten Tetrapeptidester als

oben, auf dieser Stufe mußte jedoch die Carboxylschutzgruppe hydrogenolytisch abgespalten werden; die Verknüpfung von Boc-Cys(MBzl)-ONp mit dem Tetrapeptid in DMF/Wasser verlief schlecht reproduzierbar, weil einerseits nach Neutralisation mit TAA das Tetrapeptid gelartig ausfiel und durch Wasserzugabe wieder in Lösung gebracht werden mußte, andererseits das Boc-Cys(MBzl)-ONp bei Wasserzugabe z.T. wieder ausfiel. Auch eine Kupplung in 5 %iger NaHCO_3 -Lösung mit DMF verlief nicht besser. Das Problem verstärkte sich noch bei der anschließenden Kupplung von Boc-His(Boc)-ONp oder Boc-His(Tos)-ONp an das freie Pentapeptid, denn die geschützte Hexapeptidsäure ist ebenfalls sehr schwer löslich; sie löst sich nicht in heißem DMF, sondern quillt nur darin. Dieses Derivat erscheint für weitere Umsetzungen ungeeignet, zumal auch hierbei die Imidazol-Schutzgruppen z.T. abgespalten waren.

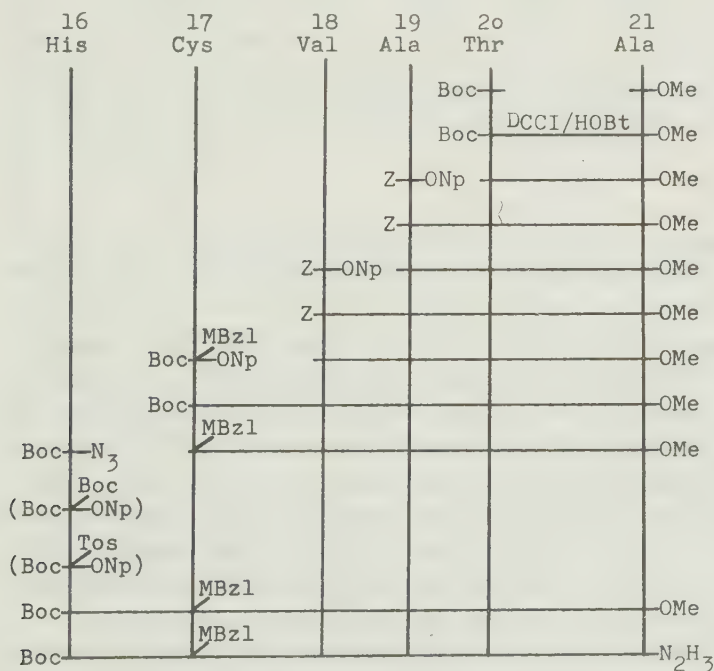


Abb. 9 : Synthese-Schema Sequenz 16-21

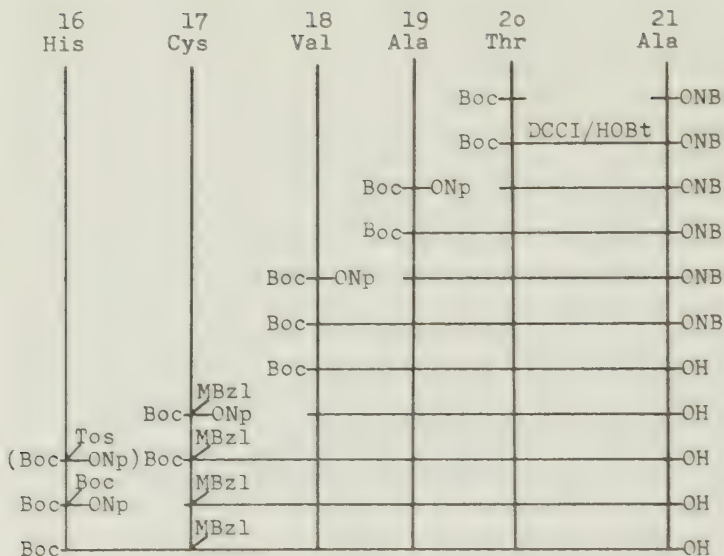


Abb. 10 : Synthese-Schema Sequenz 16-21
(zweiter Weg)

5.3.3. Sequenz 16-27 (His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys-NH₂)

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die geschützte Peptidsäure 15-21 wegen Unlöslichkeit nicht für eine Kupplung mit dem ebenfalls sehr schwerlöslichen Peptidamid-Trifluoracetat 22-27 mittels DCCI/HOBt in Frage kommt, blieb nur die Kupplung der Sequenz 15-21 mit Peptidamid 22-27 nach der Azidmethode. Diese wurde in der von RUDINGER [68] eingeführten Form mit iso-Amylnitrit versucht. Nach 3 Tagen Reaktionszeit war jedoch bei zwei Ansätzen keinerlei Umsatz festzustellen. Ähnliche Schwierigkeiten bei Azidsynthesen sind aus der Literatur bekannt, z.B. bei der Synthese der Insulin A-Kette, wobei das Azid des Nonapeptids A 1-9 nicht mit A 10-21 zu verknüpfen war [103].

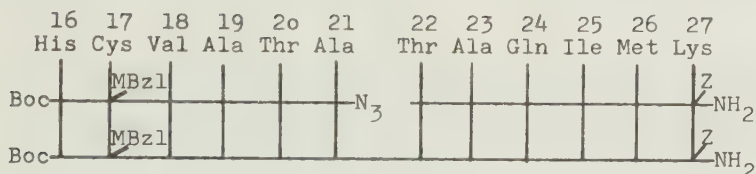


Abb. 11 : Synthese-Schema Sequenz 16-27

5.3.4. Sequenz 18-25 (Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile)

Aus den vorhandenen Teilstücken 18-21 und 22-25 ließ sich das Oktapeptid Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB in guter Ausbeute und Reinheit durch Verknüpfung mit DCCI/HOBt herstellen. Das Peptid fällt zwar während der Synthese in DMF aus, da jedoch die Ausgangskomponenten gut in DMF löslich sind, mußte nur für die Abtrennung des mit ausgefallenen DC-Harnstoffs durch mehrfaches Auskochen mit iso-Propanol gesorgt werden.

Die anschließende hydrogenolytische Spaltung des p-Nitrobenzylesters bereitete jedoch Schwierigkeiten wegen der schlechten DMF-Löslichkeit des Oktapeptidesters. Nach 4-tägiger Hydrogenolyse (4 g in 250 ml) - wobei der Hydrieransatz immer wieder erwärmt wurde - gelang schließlich die hydrogenolytische Spaltung des p-Nitrobenzylesters. Hydriert wurde jedoch nur bei Zimmertemperatur. Bei allen Hydrierungen in DMF, unabhängig von der Sequenz, die bei erhöhter Temperatur (60-80°C) vorgenommen wurden, hatte sich nämlich gezeigt, daß 1. Nebenprodukte entstehen und 2. die Ansätze schwarzgrün werden und nicht mehr zu entfärben sind.

18	19	20	21		22	23	24	25
Val	Ala	Thr	Ala		Thr	Ala	Gln	Ile
Boc			ONB		Boc			ONB
Boc			OH					ONB
Boc			DCCI/HOBt					ONB
Boc								OH

Abb. 12 : Synthese-Schema Sequenz 18-25

5.3.5. Sequenz 11-15 (Gln-Ala-Ala-Thr-Gly)

Die Synthese dieses Pentapeptid-Derivates bereitete, ausgehend sowohl von Gly-OMe x HCl als auch von Gly-ONB x HBr, bis zur Tetrapeptidstufe keine Schwierigkeiten. Um für anschließende Kupplungsversuche mit dem Pentapeptid flexibel zu sein und um einer möglichen Bildung des Pyroglutaminsäurederivates [104-113] begegnen zu können, wurde Glutamin 11 einmal als Boc-Gln-ONp, (mit dem Tetrapeptid-Methyl- und p-Nitrobenzylester) dann als Boc-Gln(Pmb) (mit dem Tetrapeptid-p-Nitrobenzylester) und schließlich als Z-Gln(DMBH)-ONp (mit dem Tetrapeptid-Methyl- und p-Nitrobenzylester) umgesetzt.

Während die Peptidester mit ungeschützter Amidgruppe des Glutamins in DMF noch löslich sind, ebenso wie das an der Amidgruppe durch Pmb-geschützte Derivat, sind die Z-Gln(DMBH)-Verbindungen in beiden Fällen sehr schwer löslich in DMF.

Die Hydrazinolyse des Pentapeptidmethylesters mit freier Gln-Amid-Gruppe in DMF führt zu einem in DMF völlig unlöslichen Boc-Pentapeptidhydrazid. Die Hydrogenolyse des Z-Gln(DMBH)-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB gelang in DMF trotz der

Schwerlöslichkeit, weil das freie Pentapeptid-Derivat in DMF/Wasser löslich ist.

Nach der Hydrogenolyse des Boc-Gln(Pmb)-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB bereitete die Abtrennung der farbigen Nebenprodukte (p-Amin-toluol und Folgeprodukte) erhebliche Schwierigkeiten, da die Peptidsäure nur gallertig anfiel.

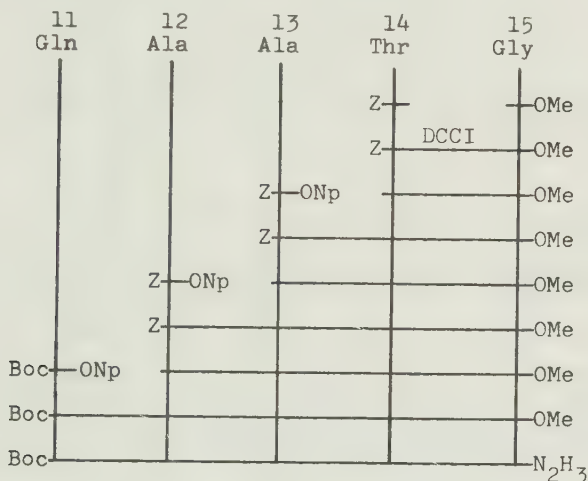


Abb. 13 : Synthese-Schema Sequenz 11-15

}

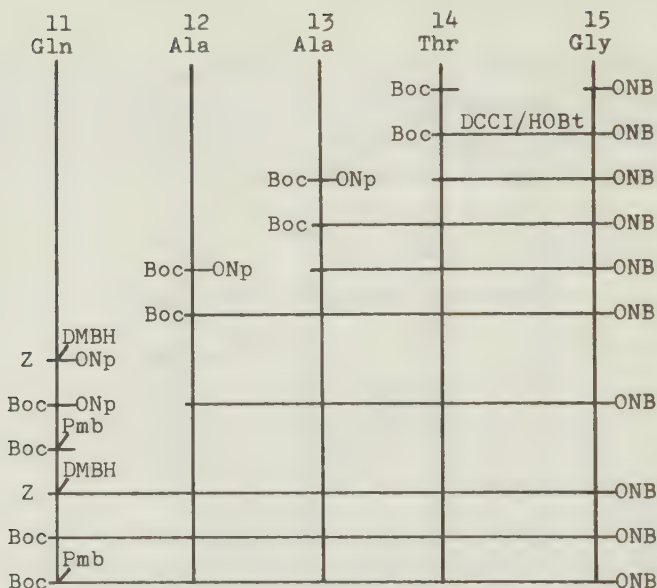


Abb. 14 : Synthese-Schema Sequenz 11-15
(zweiter Weg)

5.3.6. Sequenz 5-10 (Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly)

Durch schrittweise Synthese - ausgehend vom carboxylendständigen Glycin-Methylester und p-Nitrobenzylester mit Z-Val-ONp und Z-Phe-ONp-konnten die beiden Tripeptidester leicht hergestellt werden, wenn auch die Kristallisation des Z-Phe-Val-Gly-ONB einige Mühe bereitete. Serin 7 wurde dann sowohl als Z-Derivat mit freier OH-Gruppe als auch als t-Butyläther mit DCCI/HOBt mit beiden am Aminoende deblockierten Tripeptidestern ohne Schwierigkeiten umgesetzt.

Die weitere Umsetzung des Tetrapeptidmethylesters mit freier OH-Gruppe des Serin mit Boc-Gln-ONp lieferte ein nur noch in

heißem DMF lösliches Produkt; die Umsetzung des O-t-Butyl-Serin-Derivates mit Boc-Gln-ONp und Z-Gln-(MBH)-ONp ebenfalls. Die Einführung der Schutzgruppen hatte also die Löslichkeitsverhältnisse keinesfalls verbessert.

Ging man vom Tetrapeptid-p-Nitrobenzylester aus, erhielt man mit Boc-Gln-ONp noch ein DMF-lösliches Pentapeptidderivat. Die Hydrogenolyse des p-Nitrobenzylesters ließ sich auf dieser Stufe in DMF durchführen. Anschließende "Salzkupplungen" mit Z-Glu(OBut)-ONp bzw. Boc-Glu(OBzl)-ONp führten dann zu den teilgeschützten Hexapeptidsäuren, die in warmem DMF noch löslich waren.

Die Hydrogenolyse des p-Nitrobenzylesters schon auf der Tetrapeptidstufe bewährte sich nicht, da die Tetrapeptidsäure gallertig anfiel und verlustreiche Umfällungen zur Entfärbung vorgenommen werden mußten.

Ein weiteres Problem dieser Sequenz war die vermutliche Bildung des Pyroglutaminsäure-Derivates 6-10 nach TFA-Abspaltung des Boc-Restes und längerem Stehenlassen: Nach 12 Stunden zeigten sich Spuren eines Ninhydrin-negativen, Chlor-Tolidin-positiven Nebenproduktes, nach 3 Wochen war die Menge dieses Nebenproduktes auf ca. 40 % angewachsen. Es wurde aus diesem Grunde immer nur frisch deblockiertes Material sofort weiterverarbeitet.

Das Hexapeptidhydrazid Z-Glu(OBut)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-N₂H₃ war in DMF unlöslich, es fiel bei der Synthese als schlecht zentrifugierbares Gel an. Infolge seiner Schwerlöslichkeit erscheint es für weitere Umsetzung ungeeignet.

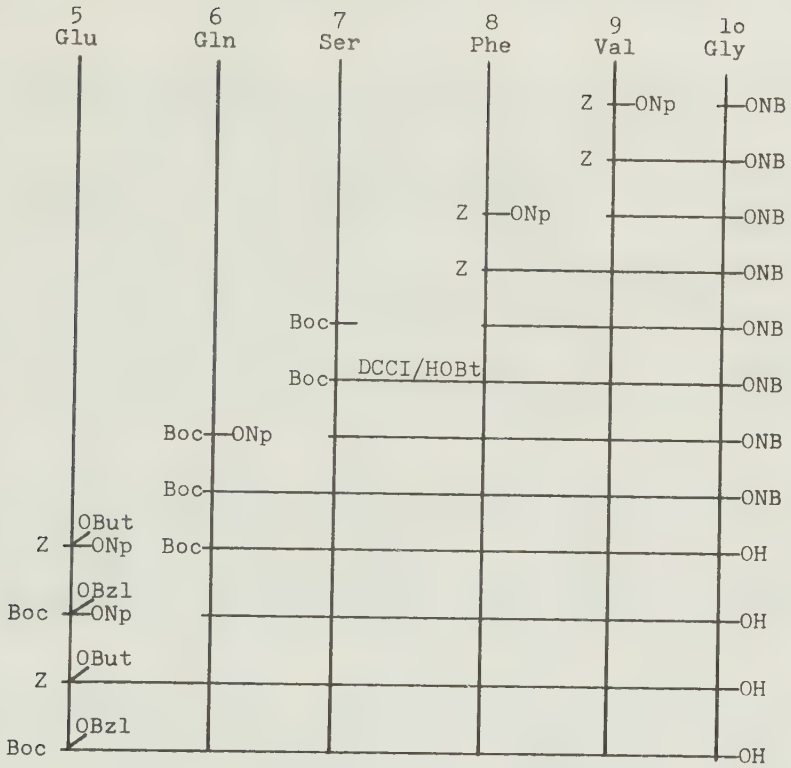


Abb. 16 : Synthese-Schema Sequenz 5-10
(zweiter Weg)

5.3.7. Sequenz 1-4 (Val-Lys-Pro-Gly)

Die Synthese dieses Tetrapeptids ging zunächst aus vom Gly-OMe x HCl, der mit Boc-Pro und DCCI ohne Schwierigkeiten zum kristallinen Dipeptidester umgesetzt werden konnte. Die sich an die Boc-Abspaltung anschließende Umsetzung mit Boc-Lys(Z)-ONp führte erst nach langem Experimentieren zu einem kristallinen Produkt mit reproduzierbar schlechter Ausbeute (45%). Die Kristallisation wird vor allem durch noch anwesenden nicht umgesetzten Boc-Lys(Z)-ONp gestört. Zunächst war als Grund für die schlechte Ausbeute eine Diketopiperazin-Bildung auf der Dipeptidstufe vermutet worden; dafür ließen sich aber keine Anhaltspunkte finden. Die weitere Umsetzung mit Z-Val-ONp verlief dann wieder glatt.

Die anschließende Hydrazinolyse des geschützten Tetrapeptidesters verlief ohne Schwierigkeiten, während die Hydrolyse sehr verlustreich war und eine nicht kristallisierbare Gallerte lieferte, die jedoch zum kristallisierten geschützten Tetrapeptid p-Nitrophenylester umgesetzt werden konnte.

Ging man von Glycin-p-Nitrobenzylester aus, so ließ sich das Peptid Z-Lys(Boc)-Pro-Gly-ONB problemlos aufbauen, die anschließende Hydrogenolyse lieferte das nur noch an der ε-Aminogruppe des Lysins geschützte Tripeptid, das mit Boc-Val-OSu in DMF/H₂O zur Tetrapeptidsäure umgesetzt werden konnte, die für alle Verknüpfungsmethoden (außer Azid) zur Verfügung steht.

Parallel zu dieser Synthese wurde das Tetrapeptid auch noch von Gly-ONp x HBr ausgehend mit Boc-Pro, Boc-Lys(Z), Z-Val und DCCI synthetisiert. Hier war auf der Dipeptidstufe besondere Vorsicht wegen möglicher Diketopiperazinbildung durch Carboxylaktivierung geboten. Das geschützte Tripeptid fiel jedoch in guter Ausbeute und Reinheit kristallin an. Der weitere Umsatz zum geschützten Tetrapeptid-p-Nitrophenylester verlief ebenfalls glatt. Diese Synthese ging am schnellsten, da alle Zwischenprodukte außer Lys(Z)-Pro(Gly)-ONp x HCl

sehr gut kristallisieren und gut umkristallisiert werden können.

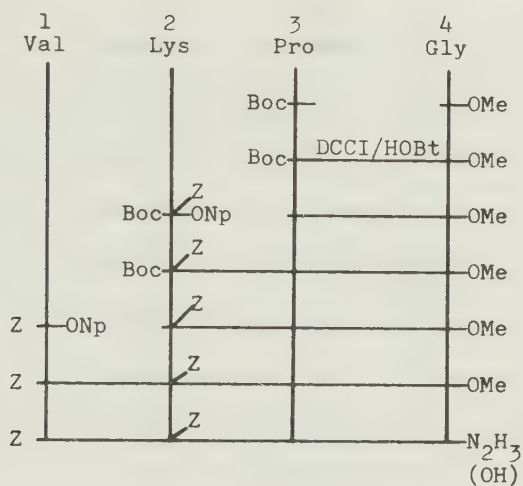


Abb. 17 : Synthese-Schema Sequenz 1-4

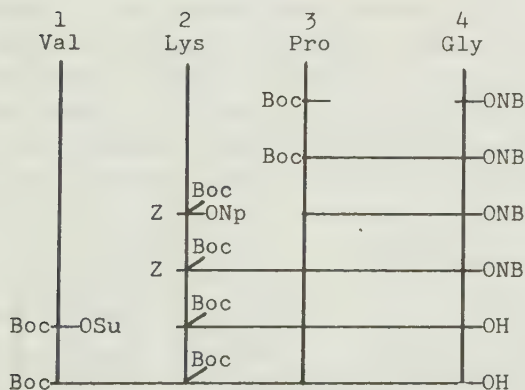


Abb. 18 : Synthese-Schema Sequenz 1-4
(zweiter Weg)

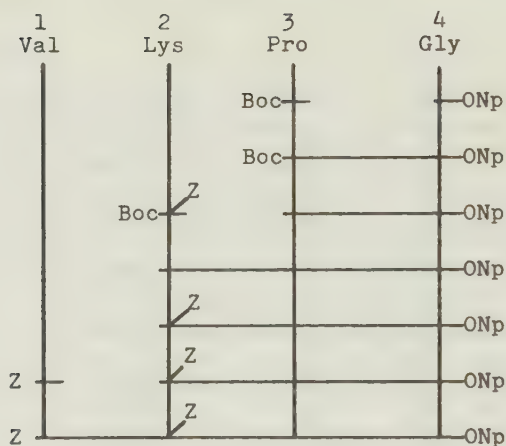


Abb. 19 : Synthese-Schema Sequenz 1-4
(dritter Weg)

5.3.8.

Sequenz 5-15 (Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly)

Die Verknüpfung von Z-Glu(OBut)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH mit Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB x TFA wurde mit DCCI/HOBt vorgenommen. Dabei erhält man ein Produkt, von dem 1 g nur noch in 100 ml kochendem DMF löslich sind, das nach Wegnahme der Heizquelle jedoch sofort geliert: Eine Hydrogenolyse der Schutzgruppen wurde nicht versucht; sie erscheint aussichtslos.

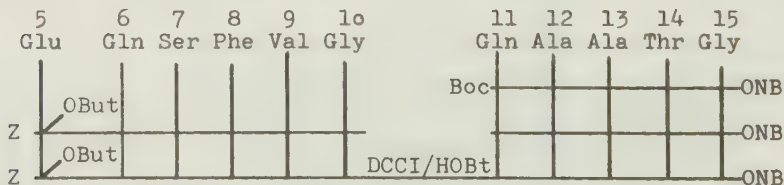


Abb. 20 : Synthese-Schema Sequenz 5-15

5.3.9. Sequenz 1-10 (Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly)

Die Reaktion des geschützten Tetrapeptid-p-Nitrophenylesters 1-4 mit Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH lieferte die wiederum in DMF schwerlösliche Decapeptidsäure 1-10. Ihr Umsatz zum p-Nitrophenylester gelang nur z.T. Eine Abtrennung nicht veresterten Materials war erfolglos. Das Produkt ist also nur für eine Kupplung mit DCCI/HOBt oder evtl. nach der Mixed-Anhydrid-Methode zu gebrauchen; das heißt, daß es nicht mit der Peptidsäure 11-16 (wegen freier Carboxylgruppe) sondern höchstens mit dem Peptidamid 11-27 umgesetzt werden kann.

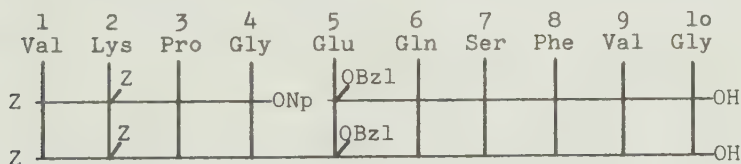


Abb. 21 : Synthese-Schema Sequenz 1-10

6. Generaldiskussion

6.1. Merrifield-Synthesen

Die Merrifield-Synthese des 27er Peptids hat gezeigt, daß dieses Verfahren für diese Sequenz nicht geeignet erscheint. Ein Grund dafür ist u.a. die mangelnde Stabilität der verwendeten Z-Gruppe für die ϵ -Aminofunktion des Lysins, wie an Modellstudien nachgewiesen werden konnte. Dies wirkte sich bei dieser Synthese besonders nachteilig deshalb aus, weil Lysin carboxylendständig steht. Bei einer Wiederholung der Synthese müßte entweder auf die Dipmoc-Gruppe [98], die sich in den beschriebenen Modellversuchen als beständig erwiesen hat, oder auf die inzwischen vorgeschlagene Z(oBr)-[97] oder Z(2,4-diCl)-Gruppe [92] übergegangen werden, welche mit HF abgespalten werden können.

Mit dem Boc-His(Boc)-ONp hat man jetzt ein Histidin-Derivat, das in den Kupplungsausbeuten den Derivaten anderer Aminosäuren entspricht. Ob der Verlust der Im-Schutzgruppe während der Synthese Nachteile mit sich bringt, müßte noch überprüft werden.

In neuester Zeit ist berichtet worden [97], daß der S-p-Methoxybenzyl-Rest bei längerer bzw. wiederholter Acidolyse nicht 100 %ig stabil ist. Nach 23 Stunden in TFA/Methylenchlorid war dieser Rest beim Acetyl-Cys(MBzl)-NH₂ zu 20-27 % verlorengegangen [97]. Andererseits stellte LÜBKE [30] fest, daß sich die S-p-Methoxybenzylschutzgruppen von einer A-Kette des Insulins innerhalb von 30 Min. mit HF nicht quantitativ abspalten ließen. Als bessere Schutzgruppe wird jetzt der 3,4-Dimethylbenzylrest empfohlen.

Man sieht also, daß die Frage der Stabilität der Schutzgruppen nach wie vor ein zentrales Thema der Merrifield-Syntheseforschung sein muß. Dabei erscheint es geboten, die Stabilitätsuntersuchungen am Harz durchzuführen, weil man nicht von

vornherein sicher sein kann, daß die in Lösung gefundenen Verhältnisse ohne weiteres auf die Verhältnisse am Harz übertragen werden können.

Ein weiteres Thema, dem sich das Interesse zuwendet, ist der Kupplungsschritt selbst. Nach WUNSCH [63] ist der derzeit noch üblicherweise zeitlich fixierte stufenweise Anbau der Boc-Aminosäuren eine der Hauptfehlerquellen der Merrifield-Technik.

Eine Voraussage über die jeweiligen Umsetzungsgeschwindigkeiten ist aber kaum möglich. Diese hängen nicht nur von den betreffenden Aminosäuren ab, sondern auch von der sich laufend ändernden Konformation des Peptids am Harz und von der Diffusionsgeschwindigkeit der Reagenzien, für jeden Einzelfall müßten die besten Bedingungen vorher experimentell gesucht werden. Damit wäre aber der Hauptvorteil der Merrifield-Synthese, nämlich Geschwindigkeit und Automatisierung der Synthese hinfällig, ganz abgesehen von den ungelösten analytischen Problemen dieses Vorhabens.

Zur Lösung des Diffusionsproblems wurden Alternativen vorgeschlagen, z.B. die Verwendung "pellicularer" Silicate (Bürstenharze) mit organischen Aufhängegruppierungen an der Oberfläche [114,115] oder die "Liquid-Phase"-Methode von BAYER und MUTTER [116]. Die zuerst genannte Harzvariation hat sich bei den eingehenden Untersuchungen von BAYER über Fehl- und Rumpfsequenzenbildung beim Peptid (Leu-Ala)₆ als dem normalen Harz überlegen gezeigt [117].

Wie auch hier festgestellt wurde, z.B. bei der Kupplung von Thr 22 auf Ala 23, treten immer wieder Fälle auf, bei denen die übliche DCCI-Kupplung auch schon bei kurzen Peptiden zu keinem annähernd quantitativen Umsatz führt. Da eine Wiederholung der Kupplung nur eine geringfügige Verbesserung brachte, erscheint es besser, bei Wiederholungen auch die Kupplungsmethode zu wechseln. HAGENMAIER [118] und FLOR [119]

haben schon dadurch Fortschritte erzielen können, daß sie Boc-Aminosäure und DCCI außerhalb des Reaktionsgefäßes zum symmetrischen Anhydrid umgesetzt haben, das sie nach Abtrennung des DC-Harnstoffs in die Synthese eingesetzt haben. Damit fallen auch Diffusionsstörungen durch im Harz ausfallenden DC-Harnstoff weg.

Besonders schlechte Erfahrungen wurden in der vorliegenden Arbeit mit der Synthese von Peptidfragmenten an fester Phase gemacht. Durch die Notwendigkeit, geschützte Peptide zu gewinnen, ist man auf die Hydrazinolyse des Peptidharzes angewiesen und damit auf die Azidkupplung. Diese verläuft jedoch oft mit schlechten Ausbeuten. Wegen der Möglichkeit der Azid-Isocyanat-Umlagerung ist mit der Bildung von Harnstoff-Derivaten zu rechnen, welche nicht mehr abgetrennt werden können. Die Eigenschaften der synthetisierten Hydrazide und Amide sind schlecht abzuschätzen. Wenn drei von den vier in dieser Arbeit dargestellten Hydraziden und ein Amid sehr schwer löslich sind in DMF, erreicht man nur minimale Ausbeuten von Produkten, die nicht zu reinigen sind. Auf die Einschränkungen für Aminolyse und Hydrazinolyse bei Glutaminsäure- und Asparaginsäure-haltigen Peptiden wurde schon hingewiesen. WEYGAND [120] hat vorgeschlagen, die Benzylester-Gruppierung am Harz durch eine Phenacylestergruppe zu ersetzen, welche durch Thiophenolat zu spalten wäre und somit geschützte Peptidsäuren liefern könnte. Dazu liegen jedoch noch keine Erfahrungen vor. Bis jetzt wurde nur einmal [121] von der Verwendung von Merrifield-Produkten zu Fragmentkondensationen berichtet. Auch dabei waren unreine Peptide erhalten worden.

6.2. Klassische Synthesen

Die bisher durchgeführten Versuche zur klassischen Synthese des Heptecosapeptids haben in vielen Fällen zu sehr schwer löslichen geschützten Teilpeptiden geführt. Daher war es nicht möglich, Fragment 16-21 mit 22-27 mit Hilfe einer Azidsynthese

zu verknüpfen. Infolgedessen konnte auch der vorgesehene schrittweise Anbau der Fragmente 11-15 und 1-10 noch nicht vollzogen werden. Die Verknüpfung von 5-10 mit 11-15 führte ebenfalls zu einem nur noch in kochendem DMF löslichen Peptid, das sich nicht mehr hydrieren ließ.

Die Synthese der Peptidsäure 1-10 über den geschützten Tetrapeptid-p-Nitrophenylester 1-4 verlief glatt. Die anschließende Umsetzung mit p-Nitrophenol zum aktiven Ester führte jedoch wegen der unvollständigen Reaktion zu einem Gemisch aus Säure und Ester, das noch nicht getrennt werden konnte.

Da nach den bisherigen Erfahrungen damit zu rechnen ist, daß ein geschützter Pentadecapeptid-p-Nitrobenzylester nicht hydrogenolytisch zu spalten ist, kann nur der aktive Ester 1-10 mit der freien Säure 11-15 umgesetzt werden.

Der aufwendige Schutz der Amidgruppe des Glutamins hat sich in keinem Fall gelohnt. Die Löslichkeitsprobleme wurden dadurch eher noch verstärkt. Immerhin sind die verwendeten Pmb- und DMBH-Schutzgruppen für die Verhinderung der Bildung von Pyroglutaminsäure-Derivaten von Nutzen.

Die Synthese des Octapeptid p-Nitrobenzylester 18-25 ging gut. Auch die Hydrogenolyse der Carboxylschutzgruppe gelang noch. Der weitere Verlauf der Synthese sollte folgenden Weg nehmen: Sequenz 18-25 muß mit dem Dipeptidamid 26-27 über DCCI/HOBt verknüpft werden. An das erhaltene Dekapeptid soll schrittweise zunächst mit Cystein, danach mit Histidin zum carboxylendständigen Dodecapeptid umgesetzt werden. Das Dodecapeptid kann dann mit der löslichen Peptidsäure 11-15 umgesetzt werden. Der Schluß wäre dann eine Kupplung 1-10 mit 11-27.

Sollte auch dieses Verfahren an Löslichkeitsfragen scheitern, so müßte die Strategie der Synthese evtl. in Richtung auf einen maximalen Seitenkettenschutz geändert werden; das betrifft vor allem das Threonin. Das müßte aber auch eine teil-

weise Änderung der Aminoschutzgruppen zur Folge haben. So kann z.B. in Fragment 16-27 Threonin nur dann t-Butylgeschützt eingesetzt werden, wenn nach Einbau der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin mit dem NPS- oder Bpoc-Schutz weitergearbeitet wird.

Da die klassische Synthese der Partialsequenz noch nicht abgeschlossen ist, ist es noch nicht möglich, ein abschließendes Urteil über die Ergebnisse zu fällen. Immerhin steht fest, daß die Merrifield-Synthese in keinem Fall zu einem befriedigenden Produkt geführt hat. Die Merrifield-Synthese von Fragmenten hat sich ebenfalls nicht bewährt. Es war noch nicht einmal möglich und sinnvoll, mit den Merrifield-Produkten orientierende Versuche zur weiteren Verknüpfung der Fragmente durchzuführen.

WEBER hat kürzlich über Versuche berichtet [122], klassisch vorgefertigte Peptide (Azide) mit Aminosäure-Harzen und Peptid-Harzen zu verknüpfen. Abgesehen davon, daß die Verwendung von geschützten Peptiden, die als Carboxylkomponente im Überschuß einzusetzen sind, ein sehr aufwendiges und kostspieliges Verfahren ist, treten natürlich auch hierbei durch unvollständigen Umsatz Reinigungsprobleme auf. Immerhin sind nicht wie bei der üblichen schrittweisen Merrifield-Synthese Peptidfamilien, die sich nur durch eine Aminosäure unterscheiden, zu erwarten, sondern Peptide mit definierten Molekulargewichtsunterschieden, die sich leichter trennen lassen. Auch bei der klassischen Synthese ist man manchmal darauf angewiesen, in Gegenwart nicht umgesetzter aber auch nicht abtrennbarer Carboxyl- oder Aminokomponenten den nächsten Kupplungsschritt durchzuführen und auf eine Reinigungsmöglichkeit des deblockierten fertigen Peptids zu bauen.

Da inzwischen [70,123,124] Methoden für racemisierungsfreie Verknüpfung erarbeitet worden sind, könnte man bei der Festlegung der Schnittstellen für die einzelnen Fragmente flexibel sein.

Dieses kombinierte Verfahren wäre vielleicht, nach der Einführung der HF-Methode und der Bpoc-Schutzgruppe, der dritte wesentliche Beitrag, mit dem Merrifield-Peptidchemiker die klassische Peptidchemie bereichern könnten.

Die auch schon diskutierte Möglichkeit [63], unlösliche Fragmente ähnlich wie das unlösliche Polymer quellen zu lassen und als eigenes Trägermaterial zu benutzen, scheint sich nach anfänglichen Hoffnungen [63] nicht bewährt zu haben [125].

B Experimenteller Teil

1. Allgemeines

Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf das gereinigte Produkt mit den angegebenen physikalischen Daten.

Die Schmelzpunkte wurden in dem Gerät nach Dr. Tottoli (Büchi) bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.

Optische Drehungen wurden mit dem Polarimeter 141 (Perkin-Elmer) bestimmt.

Die Elementaranalysen wurden im Analytischen Labor des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Tübingen (Frau Akad. Oberrätin Dr. A.M. Fretzdorff), im Mikroanalytischen Labor Robert Glier, Röthlein ü. Schweinfurt, und in der Zentralen Analytik des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg durchgeführt.

Die Aminosäureanalysen wurden mit Beckman-Unichrom-Analysator bei Frau Dr. Fretzdorff im Physiol.-Chem. Institut der Universität Tübingen; mit dem Biochrom-Aminosäureanalysator der Fa. Biocal München im Dt. Wollforschungsinstitut (Direktor: Prof. Dr. H. Zahn) von Herrn Dr. Föhles; im Institut für Biopolymere der Universität Marburg von Frau Dr. Ebert sowie zum Schluß der Arbeit im Physiol.-Chem. Institut II der Universität Marburg durch Herrn Dipl. Biochemiker H.G. Löffler am Beckman Unichrom durchgeführt.

Die potentiometrischen Chlorid-Bestimmungen (Dorman-Titration) wurden mit dem Beckman Research pH-Meter durchgeführt.

Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit Kieselgel SIF beschichtete Aluminiumfolien der Firma Riedel de Haen, Hannover, benutzt. Als Laufmittel dienten:

- I n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)
- II n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30:20:6:24)
- III n-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylenchlorid/
Wasser (4:1:1:1:2:1)
- IV Propanol/Ammoniak/Wasser (6:3:1)
- V Chloroform/Eisessig (9:1)
- VI Chloroform/Cyclohexan/Eisessig (45:45:10)
- VII Diisopropyläther/Chloroform/Eisessig (6:3:1)

Wegen der Schwerlöslichkeit vieler Verbindungen in den üblichen Lösungsmitteln wurde häufig zur Chromatographie in Trifluoräthanol gelöst. Wegen seiner guten Lösungseigenschaften und seines rel. niedrigen Siedepunktes eignet es sich wesentlich besser als z.B. DMF zum Auftragen.

Verbindungen, in denen die Aminogruppe frei oder durch die Boc-Gruppe geschützt vorlag, wurden durch Besprühen mit einer 5 %igen Lösung von Ninhydrin in Butanol/ 2 N Essigsäure (95:5 v/v) und kurzes Erhitzen im Trockenschrank (110°C) sichtbar gemacht [126]. Außerdem wurde die Chlor-Tolidin-Reaktion (Besprühen mit 0,05 M wässriger Boraxlösung, Einstellen in Chloratmosphäre und anschließend - nach kurzem Erhitzen - mit einer essigsauren Lösung von o-Tolidin und Kaliumjodid angewandt [127,128]. Mit Ninhydrin behandelte Chromatogramme lassen sich ohne Störungen anschließend noch mit Chlor-Tolidin besprühen. Histidin-haltige Verbindungen wurden außerdem noch mit dem Pauly-Reagenz sichtbar gemacht [129].

L-Aminosäuren wurden in der von den Firmen Merck, Serva und Ajinomoto Co., gelieferten Reinheit benutzt. Dicyclohexylcarbodiimid und HBr in Eisessig der Firmen Fluka, Merck und Riedel de Haen wurden ungereinigt verwandt. p-Nitrophenol wurde aus 3 %iger Salzsäure mit Aktivkohle umkristallisiert. Pyridiniumchlorid wurde hergestellt durch Eintropfen von äquivalenter Menge Pyridin in Äther in eine gekühlte Lösung von Chlorwasserstoff in Äther. Der anfallende, äußerst

hygroskopische Niederschlag wurde aus Methanol/Äther/Petrol-äther umkristallisiert.

Dimethylformamid (2500 g) wurde durch Destillation i.V. mit Benzol (300 g) und Wasser (120 g) von Verunreinigungen befreit. Hexamethylphosphorsäuretriamid wurde i.V. unter Stickstoffatmosphäre destilliert. Pyridin wurde nach Vortrocknung über KOH mit Calciumhydrid gekocht und destilliert.

Äther, Tetrahydrofuran und Dioxan wurden nach Vortrocknen über Calciumchlorid bzw. Kaliumhydroxid über Natrium gekocht bis zur Benzphenon-blauen Reaktion und anschließend destilliert. Methanol und Äthanol wurden mit Hilfe von Magnesiumspänen (20 g/ 4 l) absolutiert.

Methylenchlorid wurde über Kaliumcarbonat destilliert und anschließend über Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe 1) filtriert. Essigsäure wurde über Phosphorpentoxid destilliert. Triäthylamin wurde nach Vortrocknen mit Kaliumhydroxid über Phthalsäureanhydrid destilliert.

Alle übrigen Reagenzien und Chemikalien wurden in der von den Firmen Merck, Fluka, Riedel de Haen, Schuchardt, Bayer, Hoechst, Shell, BASF und Degussa gelieferten Qualität verwendet.

2. Verzeichnis der Literaturpräparate

(o.R. = ohne Reinigung verwendet; o.A. = ohne Angabe)

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	Lit.
N-Hydroxysuccinimid	94-95	62	
	97-98	75	130
1-Hydroxybenzotriazol	158-60	80	
	164-66	91	70, 131, 132
4-Acetylbiphenyl	116-18	75	
	120	60	133
4-Biphenyl-dimethyl- carbinol	85-87	82	
	92-93	78	134
[2(p-Biphenyl)-iso-propyl]- phenylcarbonat	116	78	
	115-16	88	37
[2-p-Biphenyl-iso-propyl]- [p-Methoxy-carbonyl- phenyl]-carbonat	49-52	67	
	51-52	67	40
t-Butyl-phenyl-carbonat	o.R.	95	
	Kp _{0,5} 74-78	73,5	135
t-Butyl-oxycarbonyl- hydrazid	30-40	70	
	41-42	68,3	135
t-Butyl-oxycarbonyl-azid	Kp ₁₂ 40-50	80	
	Kp ₇₀ 73-76	o.A.	135
	Kp ₁₀ 28-30		
Chlorameisensäure- benzylester	o.R.	95	
	o.R.	95-99	136
Chlorameisensäure-p- chlorbenzylester	o.R.	97	
	o.R.	o.A.	137
Chlorameisensäure- diisopropylmethyl- carbinylester	o.R.	100	
	o.R.	100	98
Chlorameisensäure-p- Nitrobenzylester	30-32	78	
	33,5-34	90	138

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	Lit.
Chlorameisensäure-m-Chlorbenzylester	o.R.	95	
	o.R.	o.A.	139
Chlorameisensäure-1-Adamantylester	35-40	92	
	41,5-42,5	o.A.	88
p-Methoxybenzyl-phenyl-carbonat	26-29	70	
	28-29	o.A.	140
p-Methoxybenzyl-oxy-carbonylhydrazid	71-73	68	
	71-74	o.A.	140
p-Methoxybenzyl-oxy-carbonylazid	28-30	74	
	30	80	140
o-Nitrothiophenyl-disulfid	198	65	
	195	66	141
NPS-Cl	74	68	
	74	71	142
N-Carbäthoxyphthalimid	78-80	78	
	80	86	99
p-Nitrobenzylalkohol	92-93	66	
	92-93	75	143
p-Chlorbenzylalkohol	70-72	84	
	72	90	144
m-Chlorbenzylalkohol	Kp ₁₂ 103-105	70	
	Kp ₁₃ 105	70	144
p-Methoxybenzylchlorid	Kp ₅ 100-102	52	
	Kp ₅ 100-101	60	145
4,4'-Dimethoxybenzo-phenon	144	78	
	144	o.A.	146
4,4'-Dimethoxybenzhydrol	72-73	75	
	72-73	75	77
Anissäurechlorid	Kp ₁₂ 135-140	74	
	Kp ₁₂ 140	80	147
Chlormethyl-methyläther	Kp 58-59		
	Kp 58-59	o.A.	148

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, L.-M.	Lit.
Ala-OMe x HCl	108-10	90	+ 8,8		
	108	90	+ 9	2, MeOH	149
Ala-ONB x Tos	153-56	88	- 4,5		
	156-58	92	- 4	1, MeOH	150
Ala-ONB x HBr	177	65	- 5,5		
	175-77,5	62	- 5,76	1, MeOH	151
Z-Ala	82-84	75	- 13,7		
	84	72	- 14,3	1, HAc	152
Z-Ala-ONB	98-99	88	- 17,8		
	98-99	94,6	- 16,8	1, MeOH	151
Z-Ala-ONp	78	74	- 39,8		
	79-79,5	58	- 38,1	1,4 EtOAc	153
Boc-Ala	80-82	86	- 25,0		
	80-82	96	- 25,2	1, HAc	87
Boc-Ala-ONp	79-80	76	- 65,5		
	82	48	- 63,5	1,53 MeOH	154
Cys(MBzl)	202-06	80	+ 23,9		
	198-99	78	+ 22,6	1,02 1N NaOH	155
Boc-Cys(MBzl)	86-89	70	- 19,4		
	90-92	68	- 22,5	1, EtOH	33
Boc-Cys(MBzl)ONp	116-17	85	- 23,8	1, MeOH	analog
	-	-	-	-	156
Cys-SEt	199-200	75	- 136		
	199-200	77	- 138	1, 0,3 N HCl	45
Boc-Cys-SEt-DCHA	136-38	65	- 101		
	137-38	69	- 104	1, MeOH	45
Boc-Gln	117-19	80	- 3,0		
	116-18	82	- 2,9	1, EtOH	87

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, L.-M.	Lit.
Boc-Gln-ONp	155-56	50	- 31,7		
	140-46	31	- 31,0	1, EtOAc	157
Z-Gln-DMBH	110-12	84	- 6,6		
	117-20	90	- 6,75	2, DMF	77
Z-Gln	134-36	71	- 7,5		
	137	78	- 7,1	2, EtOH	158
Glu(OBzl)	182-85	64	+ 18,4		
	189	76	+ 19,4	6, HAc	159
Boc-Glu(OBzl)- DCHA	138-40	48	- 3,2		analog 87, pH 9,3
	140-42	93 46	- 3,9	HAc	78 160
Boc-Glu(OBzl)- ONp	117-19	85	- 29,4		
	120-21	52	- 32,7	1, MeOH	160
Boc-Glu	112-15	88	- 15,5		
	110-12	97	- 15,2	1, HAc	87
Boc-Glu 	115-16	93	- 47,2		
	115-16	93	- 47,7	1, HAc	161
Boc-Glu-α-OBzl-	173-74	62	- 18,8		
γ-DCHA	172	66	- 19,2	0,7, MeOH	161
Boc-Glu-α-OBzl	93-95	75	- 29,9		
	93-93,5	81	- 30,2	1, MeOH	161
Boc-Glu-α-OBzl-	94-96	74	- 15,2	1, MeOH mittels	
γ-Pmb				M.A. nicht DCCI	
	108-109	0.A.	0.A.	0.A.	76
Boc-Gln(Pmb)	92-93	87	- 1,9	1, MeOH	
	96-97	0.A.	0.A.	0.A.	76
Z-Glu	116-18	85	- 7,2		
	120-21	65-80	- 7,9	10, HAc	152 162
Z-Glu 	88-91	92	- 43,4		
	94	70	- 45,1		163
	91-92	97	- 43,0	10,3 HAc	164

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, L.-M.	Lit.
Z-Glu-α-OMe-DCHA	168-72	60	- 10,9		
	172-73	54	- 10,9	1,02, MeOH	165
Z-Glu-α-OBzl-	159-62	54	- 12,9		
γ DCHA	161-62	59	- 12,0	2,1, MeOH	165
Z-Glu-α-OMe	62-63	65	- 25,5		
	68-69	70	- 25,9	1,06, MeOH	165
Z-Glu-α-OBzl	96-98	86	- 22,7		
	97-98	95	- 23,8	1,23, MeOH	165
Z-Glu(OBut)-OMe	Ö1	70	-		
	Ö1	77	-	-	165
Z-Glu(OBut)-OBzl	46-48	88	- 19,8	1, MeOH	
	48-49	96	- 20,8	1, MeOH	161
Z-Glu(OBut)	Ö1	80	-		
	136-37 DCHA				
	85-86	o.A.	- 16,3	1, MeOH	161
Z-Glu(OBut)-ONp	50-52	68	- 25,3		
	55-58	87	- 24,5	1, Aceton	166
Gly-OMe x HCl	175-77	100	-		
	183-84	87	-		167
Gly-ONB x HBr	192-94	85	-		
	194,5-97	89	-		158
Z-Gly	117-20	75	-		
	119-20	72	-		152
Z-Gly-ONB	105-06	90	-		
	107-09	92	-		158
Z-Gly-ONp	125-27	80	-		analog 153
	-	-	-		
Gly-ONp x HBr	210-13	90	-		
	213-213,5	96	-		153

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, L.-M.	Lit.
Boc-Gly	87-90	85	-		
	94-95	90	-		87
His-OMe x 2 HCl	199-200	90	+ 9,8		
	199-202	100	+ 10,2	2, H ₂ O	168
His(Bzl)	200-210	50	+ 19,6	1, 2N HCl	
	248-49	57	+ 20,5	2, 2 H ₂ O + 1 äq. HCl	169
His-OBzl x 2 Tos	130-40	70	n.b.		
	82,85,225	85-90	- 2,4	4,7 H ₂ O	170
	146-49				
His-ONB x 2 Tos	213-17	90	+ 6,8		
	217-19	96	+ 6	1, MeOH	150
Boc-His	191-93	45	+ 12,2		
	191-93	-	+ 13,5	1, H ₂ O	79,171
Boc-His-OMe	122-23	76	- 11,2	1, MeOH	
	Öl,				172
	124-25	79	- 11,7	1, MeOH	158
	125,5-26	o.A.	- 13,6	2, Pyridin	171
Boc-His-N ₂ H ₃	140-43	80	- 23,3		
	amorph.	74,5	- 24,5	1,2 Pyridin	172
	145-46				158
Boc-His(Tos)	115-18	62	+ 11,5	1, MeOH	analog
	-	-	-	-	83
Bpoc-His(Boc)	130-31	55	+ 20		
	133-34	50	+ 21	1, MeOH	80
Boc-His(DNP)	90-91	53	+ 54,1		
	94	62	+ 55,3	1, EtOAc	86
Boc-His(Bzl)	180-82	65	+ 0,5		
	180-82	6	+ 0,5	1, HAc	87

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, L.-M.	Lit.
Boc-His(2,2,2-Tri- fluor-1-t-Boc- aminoäthyl)-OMe	55-70 60-70	81 86	- - 4	- 1, MeOH	85
Boc-His(2,2,2-Tri- fluor-1-t-Boc- aminoäthyl)	80-105 85-115	68 75	- - 4	- 1, MeOH	85
NPS-His	178-80 185-188	40 47	- 6,5 - 6,9	1, DMF	82
Adoc-His(Adoc)	133-44 140-45	70 o.A.	+ 9,7 o.A.	1, MeOH	88
Z-His(Z)	97-100 103-105	60 81	+ 34,01	3, EtOAc	84
Z-His	161-64 166-67	55 80	- 24,1 - 25	6, 6N HCl	84
Boc-Ile	68-70 66-68	88 96	+ 2,9 + 2,5	1, HAc	87
Ile-ONB x Tos	167-69 -	88 -	+ 4,0 -	1, MeOH -	analog 150
Lys(Z)	243 255	75 80	+ 15,6 + 14,0	1,6 2N HCl	101
Boc-Lys(Z)-DCHA	110-11 110-11	85 95	- 8,9 - 9,3	1, HAc	87
Lys(Z-NO ₂)	234-35 237 240-41 233-35	55 52 66 86	+ 14,0 + 13,8 + 13,8	1, 5N HCl	96 173 139
Boc-Lys(Z-NO ₂)	102-06 103-06	78 94 85	- 5,8 - 6,4	1, HAc	96 159
Lys(Z-mCl)	233-37 236 245-48	45 29 83	+ 10,8 + 12,2	1, HAc	96 139

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, L.-M.	Lit.
Boc-Lys(Z-mCl)-	99-100	80	- 6,0		
DCHA	97-99	85	- 6,4	1, HAc	96
Lys(Z-p-Cl)	250	48	+ 12,2		
	243	45	+ 11,8	1, HAc	96
	243-45	81			139
Boc-Lys(Z-p-Cl)	83-84	74	- 6,8		
	88-90	83	- 7,0	1, HAc	96
Lys(Dipmoc)	195-99	45	+ 20,2		
	198,5-200,5	57-58	+ 22,3	1, 1N HCl	98
Boc-Lys(Dipmoc)	117-18	68	+ 7,4	1, MeOH	analog
DCHA	-	-	-	-	87
Boc-Lys(Boc)	135-38	95	+ 6,1		
DCHA	136-38	93	+ 5,6	1, HAc	87
Z-Lys(Boc)	70-74	87	- 2,4		
	76-78	96	- 3,0	1, HAc	87
Z-Lys(Boc)-ONp	90-93	86	- 15,5		
	87-90	77	- 14,8	1,13 Ac	174
Boc-Lys(Z)-ONp	76-77	85	- 22,0		
	71-72		- 20,4	1,7 Dioxan	175
Z-Lys	230-35	65	- 10,8		
	232-33	71	- 12,2	5,6, 0,2 N HCl	176
Lys(Z)-OMe x HCl	115-16	75	+ 14,7		
	113-14	80	-	2, H ₂ O	177
	117	75	+ 15,0	2, H ₂ O	178
Bpoc-Lys(Boc)	88-90	63	+ 10,8	1, MeOH	
DCHA	amorph	70	+ 10,0	1, MeOH	37
Lys(Pht) x HCl	208-10	78	+ 21,2		
	212	85	+ 22,66	2, DMF	99
Boc-Lys(Pht)	167-69	82	+ 3,6	1, MeOH	
DCHA	frei, Harz	98	-		100

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, L.-M.	Lit.
Boc-Met-DCHA	135-36	92	+ 18,1		
	138-39	95	+ 19,0	1, MeOH	87
Boc-Met	44-46	-	-	-	
	47-49	25	- 21,6	0,92 MeOH	179
Boc-Met-ONp	98-100	75	- 49,5		
	96,5-97,5	45	- 50,6	1,2 MeOH	179
Boc-Pro	133-34	91	- 45,8		
	134-36	96	- 44,5	1, Dioxan	87
Z-Pro	74-76	84	- 58,4		
	77	90-95	- 60,5	2, HAc	180
Z-Phe	84-85	85	+ 5,5		
	88-89	83	+ 5,1	5, HAc	180
Boc-Phe	85-87	85	- 3,6		
	84-86	91	- 4,0	1, HAc	87
Z-Phe-ONp	125-26	68	- 25,5		
	126-126,5	75	- 24,7	2, DMF	181
DL-Ser(OBzl)	214-16	60	-	-	
	218	57-62	-	-	182 183
Acetyl-DL-Ser (OBzl)	136-40	90	-	-	
	138-40	91	-	-	184
Ser(OBzl)	213	40	+ 24,9	-	analog 185*)
	213-14	-	+ 22,7	2, 80 % HAc + 1 äq. HCl	185,**) 186
Boc-Ser(OBzl)	57-60	82	+ 34		
	57-60	60	+ 35	1, THF	187
Z-Ser	113-15	81	+ 6,4		
	119,5	90	+ 5,9	2,7 HAc	159
Z-Ser-ONB	112-15	87	- 11,2		
	115,5- 116,5	98	- 11,87	0,9 MeOH	188

*) Enzymat. Methode

**) Diastereomeren-Trennung

Verbindung	Fp. °C	% Ausb.	[α]	c, L.-M.	Lit.
Z-Ser(OBut)-ONB	68-69	80	-	-	
	68,70,5	89,5	o.A.	o.A.	188
Z-Ser(OBut)-DCHA	147	77	+ 21,5		
	149-50	o.A.	+ 22,13	1, EtOH	188
Thr(Bzl)-OBzl	166-67	20	- 44,0		
	165-67	23	- 44,6	1,2 MeOH	25
Boc-Thr(Bzl)	114-16	41	+ 14,5		
	115-16	48	+ 15,8	1,1 MeOH	25
Boc-Thr	75-76	80	- 9,9		
	74-77	88	- 9,5	1, HAc	87
Z-Thr	99-101	75	- 4,8		
	105-06	75-80	- 5,5	4, HAc	189
Z-Val	58-61	75	+ 0,2		
	66, 67	80-87	+ 0,1	10, EtOH	180
Z-Val-ONp	63-65	71	- 24,2		
	63	-	- 25,0	2, DMF	190
Boc-Val	73-75	86	+ 5,8		
	72-73	93	+ 6,0	1, HAc	87
Boc-Val-OSu	122-25	79	- 36,3		
	128-29	74	- 37,0	2, Dioxan	191

3. Versuchsbedingungen für die Merrifield-Synthesen

Chlorpolymer

Zur Chlormethylierung wurde Copolymeres aus 98 % Styrol und 2 % Divinylbenzol 200-400 mesh der Firma Fluka verwendet. Die Reaktion wurde nach Literaturvorschrift [18] durchgeführt, jedoch wurde 10-20 % mehr SnCl_2 verwendet. Die Bestimmung des Chlorgehaltes erfolgte nach Hydrolyse mit Pyridin in einer Ampulle (2 Std./100°C) durch potentiometrische Titration.

Boc-Aminosäure - Harze

Die Darstellung der Boc-Aminosäure-Harze erfolgte durch 70-stündiges leichtes Kochen der chlormethylierten Harze in abs. Äthanol mit äquivalenter Menge Boc-Aminosäure unter Zusatz von 0,9 Äquivalenten TAA. Nach den Waschvorgängen wurden die beladenen Harze jeweils 3mal im Scheidetrichter in Methylenchlorid suspendiert. Dabei flotiert die Hauptmenge an die Oberfläche und kleine Teilchen werden mit dem abgetrennten Methylenchlorid verworfen.

Die Bestimmung des Aminosäuregehaltes erfolgte nach Deblockierung einer Probe mit 1 N HCl/Eisessig und Neutralisation durch potentiometrische Chlorid-Titration.

Auf diese Weise wurden folgende Harze hergestellt:

	Chlor- gehalt (mMol/g)	Aminosäure- gehalt (mMol/g)	Chlorid- Leerwert (mMol/g)	Verwendet für
Boc-Ala-Harz	1,1	0,50	0,01	His- u. Lys- Modell- studien
Boc-Gly-Harz	2,4	1,2	0,02	Fragmente 1-4, 5-10, 11-15
Boc-Ala-Harz	2,5	1,2	0,02	Fragment 16-21
Boc-Lys(Z)-Harz	2,3	0,93	0,01	Gesamtsequenz u. Fragment 22-27
Boc-Gly-Harz	1,5	0,61	0,01	Gesamtsequenz 27 Gly statt Lys

Aufbau der Peptide am Harz

Ein Kupplungszyclus mit Umsatzkontrolle umfaßte folgende Reaktionsschritte:

Schritt Nr.	Reagenz	Vol/g Harz	Zeit (min)	
1	HAc (3 x)	20 ml	3	
2	1 N HCl/Eisessig	20 ml	30	
3	Eisessig (3 x)	20 ml	3	
4	Äthanol (3 x)	20 ml	3	
5	Methylenchlorid (3 x)	20 ml	3	
6	TAA/Methylen- chlorid (1+9)	20 ml	10	zur Titration verwendet
7	Methylenchlorid (3 x)	20 ml	3	
8	DMF (2 x)	20 ml	3	
9	CH ₂ Cl (3 x)	20 ml	3	

Schritt Nr.	Reagenz	Vol/g Harz	Zeit (min)	
10	Boc-Aminosäure in CH_2Cl_2 (5-fach)	12 ml	5	
11	DCCI/ CH_2Cl_2 (5-fach) äq. (1 g/2 ml)	zu 9	180	
12	CH_2Cl_2 (3 x)	20 ml	3	
13	Äthanol (3 x)	20 ml	3	
14	CH_2Cl_2 (3 x)	20 ml	3	
15	Pyr/HCl CH_2Cl_2 (0,3 M)	20 ml	10	
16	CH_2Cl_2 (3 x)	20 ml	3	
17	DMF (3 x)	20 ml	3	
18	TAA/DMF (1 + 9)	20 ml	10	zur Titration verwendet
19	DMF (3 x)	20 ml	3	
20	CH_2Cl_2 (2 x)	20 ml	3	

Für die Kupplung von p-Nitrophenylestern ist obige Tabelle wie folgt zu ändern:

9	DMF (3 x)	20 ml	3
10	Boc-AS-ONp	20 ml	900
11	-	-	-
12	DMF (5 x)	20 ml	3

Bei Einsatz des Blockers β -Sulfopropionsäureanhydrid änderte sich der Kupplungszyclus wie folgt:

13	DMF (3 x)	20 ml	3
14	β -Sulfopropionsäure-anhydrid (1,1 äq. bez. auf Anfangs-aminogruppen in DMF)	10 ml	1
15	2,2 äq. N-Methyl-morpholin in DMF	10 ml	60
16	DMF (3 x)	20 ml	3
17	Äthanol (3 x)	20 ml	3

dann folgt wieder Schritt 3

Bemerkungen: Ohne Umsatzkontrolle folgt auf Schritt 13 sofort Schritt 1

Für größere Ansätze als 1 g wurde die Lösungsmittelmenge auf 15 ml/g reduziert.

Das Ausgangsmaterial für die Modelluntersuchungen wurde aus Ala-Harz durch Reaktion mit Boc-Gly-Gly (5 äq.), HOBT (5 äq.) mit DCCI (5 äq.) in DMF über Nacht dargestellt.

Ausbeuten:

Synthese mit	Gesamt-Harzmenge/ Gesamtbeladung	Gewichtszunahme in g und %	Peptid- menge/ Ausbeute
Boc-His(Boc)-ONp	5 g $\hat{=}$ 4,47 mMol	10,6 $\hat{=}$ 66 %	1,5 g/ 12 %
Boc-His(Boc)-ONp u. Blocker	3 g $\hat{=}$ 2,5 mMol	4,5 $\hat{=}$ 52 %	1,5 g/ 18 %
Gly anstelle von Lysin 27	3 g $\hat{=}$ 1,87 mMol	n.b.	2,8 g/ 66 %

Abspaltung vom Harz durch Hydrazinolyse

Die Abspaltung durch Hydrazinolyse erfolgte vom nicht getrockneten Harz durch Suspension in DMF (50 ml/g Harz) und Zugabe von 10 äq. Hydrazinhydrat bezogen auf erste Aminosäure. Reaktionszeit war 3 Tage. Ausbeuten s.S.

Abspaltung vom Harz durch Amminolyse

Die Amminolyse erfolgte in DMF (50 ml/g Harz), in das das gleiche Volumen fl. NH_3 eingeleitet wurde. Nach 3 Tagen im verschlossenen Kolben wurde aufgearbeitet. Ausbeute s.S.

Abspaltung vom Harz mit HBr/TFA

Die Abspaltung vom Harz wurde im Reaktionsgefäß durchgeführt (HBr-Gas durch die Fritte leiten). Dazu wurde das Peptid-Harz in Trifluoressigsäure/Anisol suspendiert (20 ml/g Ausgangsmenge + 1 ml Anisol). Der Bromwasserstoff wurde einer Bombe entnommen, durch Waschen mit einer Lösung von Resorcin in Eisessig von Brom befreit [192] und durch Ausfrieren bei -60°C getrocknet [193]. Die Behandlung mit HBr/TFA erfolgte 60 Min. lang. Anschließend wurde vom Harz abgesaugt, 2mal mit TFA gewaschen, eingengt, mit abs. Äther gefällt, abgesaugt, mit abs. Äther gewaschen und getrocknet.

4. Synthese der Histidin-Derivate

Boc-His(Boc)-ONp

a) Synthese über Histidin-p-Nitrobenzylester

Boc-His(Boc)-ONB : (I)

19 g His-ONB x 2 Tos (0,03 Mol) wurden in 100 ml abs. Pyridin 48 Stunden mit 12,6 ml Triäthylamin (0,09 Mol) und 13 g Boc-Azid bei Zimmertemperatur gerührt; nach einer Stunde hatte sich alles gelöst. Die hellbraune Lösung wurde eingeengt, der Rückstand in 300 ml Äthylacetat aufgenommen und mit Wasser mehrmals extrahiert. Nach Trocknen und Einengen der Essigesterlösung wurde aus Äthanol/Wasser kristallisiert und aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 10 g (66 %) Fp. 112-14°C

$[\alpha]_D^{24} = -12,5^\circ$ (c = 1, Dioxan)

$C_{23}H_{30}N_4O_8$ (490,5)

Ber. C 56,32 H 6,16 N 11,42

Gef. C 56,19 H 6,12 N 11,40

Anstelle des Histidin-p-Nitrobenzylesters kann man auch den Histidinbenzylester in die Reaktion einsetzen. Nach analoger Aufarbeitung und Kristallisation aus Äthanol/Wasser sowie Essigester/Petroläther erhält man in 68 %iger Ausbeute ein Produkt vom Fp. 93-95°C

$[\alpha]_D^{24} = -6,2^\circ$ (c = 1, Dioxan)

$C_{23}H_{31}N_3O_6$ (445,5)

Ber. C 62,01 H 7,01 N 9,43

Gef. C 61,81 H 7,05 N 9,46

Boc-His(Boc) (II)

4,9 g (I) (0,01 Mol) werden in 150 ml Isopropanol unter Zusatz von 0,6 ml Eisessig mit Palladium/Aktivkohle hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde i.V. eingeeengt, der dunkel gefärbte Rückstand mit ca. 100 ml 5 %iger Natriumbicarbonatlösung versetzt und 3mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde bei 0°C mit gesättigter Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH 4 gebracht und 4mal mit Essigester extrahiert. Nach Trocknen und Eindampfen der Lösung i.V. erhielt man ein schaumiges Produkt, das sofort weiterverarbeitet wurde.

Ausbeute: 2,3 g (65 %)

$[\alpha]_D^{24} = - 2,7^{\circ}$ (c = 1, Eisessig)

$C_{16}H_{25}N_3O_6$ (355,3)

$[\alpha]_{578}^{24} = - 2,8^{\circ}$ (c = 1, Eisessig) Lit. [78]: $[\alpha]_{578}^{24} = - 1,5^{\circ}$

Boc-His(Boc)-ONp

Die Synthese erfolgte wie in [78] beschrieben aus 7,1 g (II) (0,02 Mol), 2,8 g p-Nitrophenol (0,02 Mol) und 4 g DCCI (0,02 Mol) in 100 ml THF bei 0°C. Kristallisation erfolgte aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 5,6 g (60 %) Fp. 141-143°

b) Synthese über das Boc-chlorid

Boc-His(Boc)

Zu einer Mischung aus 100 g Phosgen (1 Mol) und 74 g t-Butanol (1 Mol) in 800 ml abs. Äther ließ man bei - 40°C 79 g (1 Mol) abs. Pyridin unter heftigem Rühren zutropfen, wobei der Kolbeninhalt in einen Brei übergeht, den man durch Zugabe von Äther dünnflüssig hält. Nach 12 Stdn. bei - 20°C wurde der Ansatz im Eisbad einige Stdn. an die Wasserstrahlpumpe gehängt. Diese Suspension wurde dann in mehreren Portionen mit einer Lösung von 31 g (0,15 Mol) Histidin x HCl x H₂O

bei 0 - 5°C am pH-Stat unter Zugabe von 4 N Natronlauge zur Reaktion gebracht. Dabei hält man erst bei pH 8,2, dann bei pH 7,6. Danach wurde i.V. auf etwa 600 ml eingeeengt, mit Äther extrahiert, die wässrige Phase mit Kaliumhydrogensulfat bei 0°C auf pH 4 gebracht und mehrfach mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden mit halbgesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen, getrocknet und eingedampft. Man erhielt 30 g (57 %, bezogen auf eingesetztes His) eines Öles, das wie unter a) beschrieben zum p-Nitrophenylester umgesetzt wurde.

Z(OMe)-His

21 g His x HCl x H₂O (0,1 Mol) wurden analog der Darstellung von Boc-His mit 30 g p-Methoxybenzyloxycarbonylazid (0,15 Mol) umgesetzt. Nach Einengen, Extrahieren mit Äther, Ansäuern auf pH 4 mit Kaliumhydrogensulfat und Extrahieren mit Essigester fiel an der Grenzschicht zwischen Essigester und H₂O das Produkt aus. Es wurde abgesaugt und sorgfältig mit H₂O, Aceton und Essigester gewaschen.

Ausbeute: 14,4 g (45 %) Fp. 50-51°C

$[\alpha]_D^{24} = + 2,7$ (c = 1, Eisessig)

C₁₅H₁₇N₃O₅ (319,3)

Ber. C 56,43 H 5,37 N 13,16

Gef. C 56,22 H 5,29 N 13,25

Z(OMe)-His(ZOMe)

10,5 g His x HCl x H₂O (0,05 Mol) wurden bei pH 8 mit 21 g p-Methoxybenzyloxycarbonylazid (0,15 Mol) umgesetzt, nach Einengen, Extrahieren mit Äther und Ansäuern auf pH 4 wurde mit Essigester extrahiert; nach Abziehen des Lösungsmittels hinterblieb ein Öl.

Ausbeute: 9,5 g Öl (40 %)

C₂₄H₂₅N₃O₈ (483)

Allgemeine Vorschrift für die Darstellung der Imidazol-geschützten Histidinderivate der Tabelle 4.

2,5 g Boc-His (0,01 Mol) wurden in 80 ml Dioxan-Wasser (1:1) am pH-Stat durch Zugabe von 2 N Na_2CO_3 -Lösung bei pH 8,2 in Lösung gebracht. Danach gab man innerhalb von 15 min. 0,011 Mol des entsprechenden Chlorameisensäureesters oder Sulfonsäurechlorids in 5 Portionen unter Konstanthaltung des pH-Wertes von 8,2 hinzu. Nach 30 min. wurde i.V. eingeeengt, ausgeäthert, auf 0°C gekühlt und vorsichtig mit gesättigter Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH 4 gebracht. Die fest ausfallenden Produkte wurden abgesaugt, sorgfältig mit Wasser gewaschen und über Kaliumhydroxyd/Phosphorpentoxid getrocknet; die ölig anfallenden Produkte wurden mit Essigester extrahiert, die Lösung getrocknet und i.V. eingedampft.

Allgemeine Vorschrift für die Synthese der N- α -Boc-N-Im-X-Histidin-p-Nitrophenylester.

0,01 Mol N- α -Boc-N-Im-X-Histidin wurden in 50 ml abs. Tetrahydrofuran zusammen mit 1,4 g (0,01 Mol) p-Nitrophenol bei - 5°C gelöst, 2 g (0,01 Mol) DCCI in 20 ml Tetrahydrofuran hinzugegeben und über Nacht bei 0°C stehen gelassen. Nach Abtrennung des ausgefallenen Dicyclohexyl-Harnstoffs wurde i.V. eingedampft und der Rückstand umkristallisiert. Eigenschaften und analytische Daten der dargestellten Histidinderivate sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab. 4 : Eigenschaften und analytische Daten der synthetisierten Histidin-Derivate

Verbindung	Ausbeute bez. auf direkte Vorstufe	Fp.	$[\alpha]_D^{24}$ (c=1, Dioxan)	Ber. Gef.	Analyse		
Summenformel (Molekulargewicht)					C	H	N
					C	H	N
Boc-His(Z)							
$C_{19}H_{23}N_3O_6$ (389,4)	90 %	Schaum	+ 11,8°		58,60	5,95	10,79
					58,42	5,84	10,91
Boc-His(Z)-ONp							
$C_{25}H_{26}N_4O_8$ (510,5)	60 %	131-33°C (Essigester/ Petrolae.)	- 19,2°		58,82	5,13	10,98
					58,79	5,22	10,92
Boc-His(Z-NO ₂)							
$C_{19}H_{22}N_4O_8$ (434,4)	78 %	78-82°C (d. Ansäuern d. alkal. Lösg.)	+ 11,3°(*)		52,54	5,10	12,94
					52,33	5,02	13,08
Boc-His(Z-NO ₂)-ONp							
$C_{25}H_{25}N_5O_{10}$ (555,5)	68 %	106-08°C (Essigester/ Petrolae.)	- 15,0°		54,02	4,54	12,60
					53,93	4,62	12,29
Boc-His(Isobut)							
$C_{16}H_{25}N_3O_6$ (355,4)	90 %	Öl	+ 13,3°				
Boc-His(Isobut)-ONp							
$C_{22}H_{28}N_4O_8$ (476,5)	58 %	59-61 (EtOH / Petrolae.)	+ 7,0°		55,45	5,92	11,75
					55,98	6,01	11,58

(*) (c = 1, Methanol)

Tab. 4 : (Fortsetzung)

Z(OMe)-His(ZOMe)-ONp	45 %	110-11°C (Essigester/ Petrolae.)	- 9,5°	59,60	4,67	9,27
C ₃₀ H ₂₈ N ₄ O ₁₀ (604,6)				59,85	4,72	9,38
Boc-His(Tos)	75 %	115-18°C (d. Ansäuern d. alkalischen Lösung)	+ 11,5° (*)	52,80	5,66	10,26
C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₆ S (409,5)				52,56	5,72	10,23
Boc-His(Tos)-ONp	66 %	128-30°C (Essigester/ Petrolae.)	- 1,0°	54,33	4,94	10,56
C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₈ S (530,6)				54,34	4,87	10,53
Boc-His(Dns)	76 %	106-10°C (d. Ansäuern d. alkalischen Lösung)	+ 7,0°	56,55	5,78	11,46
C ₂₃ H ₂₈ N ₄ O ₆ S (488,6)				56,23	5,62	11,61

(*) (c = 1, Methanol)

5. Klassische Synthesen

5.1. Sequenz 22-27 (Thr Ala-Gln-Ile-Met-Lys-NH₂)

Boc-Met-Lys(Z)-OMe

43 g Boc-Met-DCHA (0,1 Mol) und 33 g Lys(Z)-OMe x HCl (0,1 Mol) wurden in 350 ml Methylenchlorid aufgeschlämmt. Bei - 5°C gab man 22 g DCCI (0,11 Mol) in 50 ml Methylenchlorid hinzu. Unter Rühren ließ man über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Dann wurde abgesaugt, der Niederschlag gut gewaschen und das Filtrat eingengt. Nach Aufnahme in Essigester filtrierte man noch einmal etwas Harnstoff ab, wusch die Essigesterlösung wie üblich, trocknete über Na₂SO₄, engte ein und kristallisierte 2mal aus Äthylacetat/Petroläther.

Ausbeute: 40 g (76 %) Fp. 73-75°

$[\alpha]_D^{24} = -14,3^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : VI und VII einheitlich

C₂₅H₃₉N₃O₇S (525,7)

Ber. C 57,13 H 7,47 N 7,99 S 6,09

Gef. C 56,84 H 7,51 N 7,84 S 5,95

Die gleiche Reaktion mit freiem Boc-Met und TAA als Base führte in gleicher Ausbeute zum gleichen Produkt. Mit Boc-Met-ONp erhielt man nur ca. 50 % Ausbeute.

Boc-Met-Lys(Z)-NH₂

10,5 g Boc-Met-Lys(Z)-OMe (0,02 Mol) wurden in 200 ml abs. Methanol gelöst und im Eisbad Ammoniak bis zur Sättigung eingeleitet. Dann ließ man den verschlossenen Kolben 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen, engte ein und kristallisierte aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 9,2 g (90 %) Fp. 147-49°C

$[\alpha]_D^{24} = -18,5^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI und VII einheitlich

$C_{24}H_{38}N_4O_6S$ (510,7)

Ber. C 56,42 H 7,50 N 10,97 S 6,28

Gef. C 56,46 H 7,67 N 10,75 S 6,72

Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA

10,2 g Boc-Met-Lys(Z)-NH₂ (0,02 Mol) wurden in 40 ml Methylenchlorid aufgeschlämmt und mit 40 ml TFA versetzt, nach 20 Min. wurde am Rotationsverdampfer eingengt, der Rückstand mit abs. Äther versetzt und verrieben. Nach Stehen im Eis wurde der Niederschlag fest. Es wurde 2mal aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 9 g (88 %) Fp. 179-80°C

$[\alpha]_D^{24} = 8,2^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II einheitlich

$C_{21}H_{31}F_3N_4O_6S$ (524,6)

Ber. C 48,08 H 5,94 N 10,67 S 6,11

Gef. C 48,41 H 6,09 N 10,44 S 6,16

Erfolgte die Abspaltung mit 70 %iger wässriger Trifluoressigsäure (3 Std.), so erhielt man sofort ein chromatographisch einheitliches Produkt.

Boc-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂

11,6 g Boc-Ile (0,05 Mol) wurden in 50 ml DMF bei -5°C mit 13,7 g (0,01 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol und 11 g DCCI (0,05 Mol) versetzt. Nach 1 Std. bei 0°C (während dieser Zeit fiel DC-Harnstoff aus) gab man 25,5 g Met-Lys(Z)-NH₂,

suspendiert in 50 ml DMF von 0°C, sowie 5 ml N-Methylmorpholin (0,05 Mol) hinzu. Nach Rühren über Nacht wurde abgesaugt und die DMF-Lösung in kalte ges. NaCl-Lösung gegeben. Dabei fiel das Produkt aus. Nach Absaugen, Waschen mit Wasser und Trocknen wurde umkristallisiert aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 28 g (86 %) Fp. 186-88°C

$[\alpha]_D^{24} = -34,6^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VII einheitlich

$C_{30}H_{49}N_5O_7S$ (623,8)

Ber. C 57,75 H 7,90 N 11,22 S 5,14

Gef. C 57,41 H 7,83 N 11,19 S 5,22

Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA

12,4 g Boc-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ (0,02 Mol) wurden 4 Stdn. lang mit 70 %iger wässriger Trifluoressigsäure stehen gelassen. Dann wurde eingeeengt und der Rückstand aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 11,5 g (90 %) Fp. 192-94°C

$[\alpha]_D^{24} = +1,3^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II einheitlich

$C_{27}H_{42}F_3N_5O_7S$ (637,7)

Ber. C 50,85 H 6,64 N 10,98 S 5,03

Gef. C 51,02 H 6,94 N 10,73 S 5,12

Boc-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂

19 g Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA (0,03 Mol) wurden in 250 ml DMF bei 0°C gelöst. Nach Zugabe von 11,1 g Boc-Gln-ONp (0,03 Mol) und 4,2 ml TAA (0,03 Mol) wurde im Eisbad gerührt. Nach 2 - 3 Stunden begann der Ansatz zu gelieren. Durch erneute DMF-Zugabe wurde für gute Durchmischung gesorgt. Nach 30 Std.

war der ganze Kolbeninhalt gallertig-fest geworden. Nach Einrühren in Eiswasser wurde abgesaugt und gut mit Wasser und 1 N NH_3 -Lösung gewaschen. Der noch feuchte Filterkuchen wurde aus Pyridin umkristallisiert.

Ausbeute: 17,5 g (77 %) Fp. 246-47°C

$[\alpha]_D^{24} = -18,6^\circ$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III eine sehr kleine Nebenbande

$\text{C}_{35}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}$ (752,0)

Ber. C 55,89 H 7,64 N 13,04 S 4,27

Gef. C 55,71 H 7,68 N 12,91 S 4,14

Gln-Ile-Met-Lys(Z)- NH_2 x TFA

a) 7,5 g Boc-Gln-Ile-Met-Lys(Z)- NH_2 wurden mit 60 ml TFA 25 Min. lang bei Zimmertemperatur behandelt. Nach Einengen und Versetzen mit abs. Äther erhielt man ein weißes Pulver; dieses ist nur in DMF löslich.

Ausbeute: 7,5 g (98 %)

DC : V, II, III : zwei Nebenbanden, davon eine mit R_F 0
(Decarbobenzoxylierungsprodukt)

b) 7,5 g Boc-Gln-Ile-Met-Lys(Z)- NH_2 (0,01 Mol) wurden 6 Std. lang in 70 %iger wässriger Trifluoressigsäure stehen gelassen. Nach Einengen i.V. bei 30°C zu einem Öl und Zugabe von Äthanol fällt das Peptidtrifluoracetat aus.

Ausbeute: 7,3 g (94 %) Fp. 230°C

$[\alpha]_D^{24} = -5,8^\circ$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III fast einheitlich, eine sehr kleine Ninhydrin- und Chlortolidin-positive Nebenbande.

$\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_9\text{S}$ (765,9)

Das Produkt wurde ohne Analyse sofort weiterverarbeitet.

Boc-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂

15,3 g Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA (0,02 Mol) wurden bei 0°C in 300 ml DMF unter Zugabe von 2,8 ml (0,02 Mol) TAA gelöst und mit 6,2 g Boc-Ala-ONp (0,02 Mol) versetzt. Man rührte insgesamt 30 Std., zuerst im Eisbad, dann bei Zimmertemperatur. Nach 3 Std. begann das Produkt gallertig auszufallen, es wurde noch etwas DMF hinzugefügt und intensiv weiter gerührt. Nach Versetzen mit Eiswasser wurde abgesaugt, mit Wasser und 1 N Ammoniaklösung gewaschen und das Peptid 2mal mit Äthanol ausgekocht.

Ausbeute: 12,7 g (77 %) Fp. 250°C

$[\alpha]_D^{24} = -6,0$ (c = 0,5, HMPT)

DC : I, II, III einheitlich

C₃₈H₆₂N₈O₁₀ (823,0)

Ber. C 55,46 H 7,59 N 13,61 S 3,89

Gef. C 55,43 H 7,52 N 13,22 S 3,99

Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA

16,5 g Boc-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ wurden mittels 70 %iger wässriger Trifluoressigsäure von der Amino-Schutzgruppe befreit (12 Std. bei Zimmertemperatur). Dann wurde eingeeengt und der Rückstand mit Äthanol/Äther verrieben.

Ausbeute: 16 g (95 %) Fp. 236-37°C

$[\alpha]_D^{24} = -8,4$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

C₃₅H₅₅F₃O₁₀S (836,9)

Ber. N 13,39 S 3,88

Gef. N 13,54 S 3,78

Boc-Gln(Pmb)-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂

12,8 g Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA (0,02 Mol) wurden in 300 ml DMF und 2,2 ml N-Methylmorpholin (0,02 Mol) gelöst, mit 4 g HOBT (0,03 Mol) und 7,4 g Boc-Gln-Pmb (0,02 Mol) versetzt und dann bei - 10°C mit 4,4 g (0,022 Mol) DCCI in 50 ml DMF. Anschließend ließ man unter Rühren auf Zimmertemperatur kommen. Nach ca. 3 Std. begannen DC-Harnstoff und ein Teil des Reaktionsproduktes auszufallen. Nach 12 Std. goß man 1,2 l Eiswasser ein, filtrierte den Niederschlag ab, wusch mit Wasser und kochte nach dem Trocknen mit Isopropanol zur Entfernung des DC-Harnstoffs 2mal aus.

Ausbeute: 14,4 g (82 %) Fp. 225-27°C

$[\alpha]_D^{24} = - 13,8$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, V noch Spuren von DC-Harnstoff

C₄₂H₆₅N₇O₁₀S (872,1)

Ber. C 59,22 H 7,51 N 11,24 S 3,68

Gef. C 58,98 H 7,42 N 11,15 S 3,73

Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂

16,8 g Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA (0,02 Mol) wurden in 250 ml DMF unter Zusatz von 2,2 ml N-Methylmorpholin (0,02 Mol) gelöst. Bei - 5°C gab man zuerst 4,8 g Boc-Thr (0,022 Mol), dann 4 g HOBT (0,03 Mol) und dann 4,4 g DCCI (0,022 Mol) in 50 ml DMF hinzu. Unter Rühren ließ man über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Nach 2 Std. begann das Produkt neben DC-Harnstoff auszufallen. Schließlich goß man den gesamten Ansatz in 1 l Eiswasser ein, saugte den käsigen Niederschlag ab und wusch mit Wasser. Nach Trocknen i.V. bei 40°C wurde 2mal mit Isopropanol und mehrmals mit Methanol ausgekocht. Das Peptid ist in allen gängigen Lösungsmitteln unlöslich.

Ausbeute: 14 g (77 %) Fp. 238-40°C

$[\alpha]_D^{24} = - 8,6$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{42}H_{69}N_9O_{11}S$ (908,1)

Ber. C 55,55 H 7,66 N 13,88 S 3,53

Gef. C 56,67 H 8,05 N 13,49 S 3,55

Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA

9,1 g Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ (0,01 Mol) wurden über Nacht mittels 70 %iger wässriger Trifluoressigsäure deblockiert. Nach Einengen und Versetzen mit Äthanol erhielt man ein weißes Produkt, das in allen Lösungsmitteln, einschließlich Wasser - außer heißem HMPT - unlöslich ist.

Ausbeute: 9,2 g (100 %) Fp. 255°C

$[\alpha]_D^{24} = -8,4^{\circ}$ (c = 0,5, HMPT)

DC : I, II, III eine kleine Nebenbande

$C_{39}H_{62}F_3N_9O_{11}S$ (922,1)

Ber. C 50,80 H 6,77 N 13,67 S 3,48

Gef. C 50,21 H 6,92 N 13,29 S 3,41

Aminosäureanalyse (6 N HCl, 110°C, 24 Stdn.)

	Thr	Ala	Gln	Ile	Met	Lys
Ber.	1	1	1	1	1	1
Gef.	0,90	1,00	1,00	1,07	0,97	1,05

Boc-Gln-Ile-ONB

24,6 g Boc-Gln (0,1 Mol) und 16,5 g HOBt (0,12 Mol) in 200 ml DMF wurden bei - 5°C mit 22 g DCCI (0,12 Mol) in 50 ml DMF versetzt. Es wurde 1 Std. lang gerührt, während dieser Zeit fiel DC-Harnstoff aus, dann gab man eine Suspension von 43,8 g Ile-ONB x Tos (0,1 Mol) in 100 ml DMF und 12 ml N-Methylmorpholin (0,1 Mol) hinzu, ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, trennte den DC-Harnstoff ab

und goß in 1,5 l ges. NaCl-Lösung von 0°C ein. Es setzte sich ein zähes Öl ab, das mit warmem Äthylacetat extrahiert wurde. Nach Trocknen und Einengen kristallisierte das Peptid aus Essigester durch vorsichtige Zugabe von Petroläther.

Ausbeute: 45 g (90 %) Fp. 132-34°

$[\alpha]_D^{24} = -21,8$ (c = 1, Methanol)

DC : VI, VII einheitlich

$C_{23}H_{34}N_4O_8$ (494,6)

Ber. C 55,78 H 6,92 N 11,33

Gef. C 55,39 H 6,95 N 11,18

Boc-Gln(Pmb)-Ile-ONB

36,1 g Boc-Gln(p-MBzl) (0,1 Mol) wurden zusammen mit 18 g HOBt (0,13 Mol) in 200 ml DMF gelöst, dann gab man bei - 5°C 22 g DCCI (0,11 Mol) hinzu, hielt eine Stunde unter Rühren bei 0°C, dabei fiel DC-Harnstoff aus, und gab dann 43,8 g Ile-ONB x Tos (0,1 Mol) in 150 ml DMF und 12 ml N-Methylmorpholin (0,1 Mol) hinzu. Nachdem der Ansatz über Nacht Zimmertemperatur erreichte, wurde der DC-Harnstoff abfiltriert und das Filtrat in eiskalte NaCl-Lösung eingerührt. Dabei fiel das Produkt aus. Nach Absaugen und Trocknen wurde umkristallisiert aus Äthanol/Petroläther und Äthanol/Wasser.

Ausbeute: 52 g (85.%) Fp. 134-35°C

$[\alpha]_D^{24} = -12,2$ (c = 1, Methanol)

DC : VI, VII einheitlich

$C_{31}H_{41}N_4O_9$ (614,7)

Ber. C 60,57 H 6,89 N 9,11

Gef. C 59,96 H 6,90 N 9,05

Gln-Ile-ONB x HCl

25 g Boc-Gln-Ile-ONB (0,05 Mol) wurden mit 150 ml 4 N HCl/Dioxan übergossen und unter Feuchtigkeitsausschluß und gelegentlichem Umschütteln 1/2 Std. stehen gelassen. Dann wurde eingeeengt und der ölige Rückstand mit 500 ml abs. Äther versetzt. Durch Reiben mit dem Glasstab ließ sich ein festes Produkt erhalten. Es wurde abgesaugt, mit abs. Äther gewaschen und sofort über KOH/P₂O₅ 1 Std. lang getrocknet (das Produkt war hygroskopisch). Ein Umkristallisationsversuch aus Wasser führte zu einem Gemisch von Ninhydrin-positivem und -negativem Material, was auf eine teilweise Pyroglutaminsäurebildung hindeutet.

C₁₈H₂₇Cl N₄O₇ (430,5)

Gln(Pmb)-Ile-ONB x HCl

12,2 g Boc-Gln(Pmb)-Ile-ONB (0,02 Mol) wurden mit 100 ml 4 N HCl/Dioxan übergossen und unter Feuchtigkeitsausschluß und gelegentlichem Umschütteln eine halbe Stunde stehen gelassen. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde aus Aceton/Äther/Petroläther ein gallertiges Produkt erhalten. Es wurde in heißem Wasser gelöst, beim Abkühlen bildeten sich etwas rötlich gefärbte Kristallnadeln. Diese wurden gesammelt und aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 8,9 g (80 %) Fp. 172-75°C

$[\alpha]_D^{24} = +16,2$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich

C₂₆H₃₅Cl N₄O₇ (551,1)

Ber. C 56,67 H 6,42 N 10,17

Gef. C 56,87 H 6,48 N 10,34

Boc-Ala-Gln-Ile-ONB

Das oben erhaltene Gln-Amid-freie Produkt wurde in 250 ml DMF gelöst, mit 15,5 g Boc-Ala-ONp (0,05 Mol) und bei 0°C mit 7 ml TAA (0,05 Mol) versetzt. Nach 24 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde in 1,5 l eiskalte ges. NaCl-Lösung eingegossen, wobei sich ein Öl abschied, das nach 2 Std. fest wurde. Der Überstand wurde 3mal mit Äthylacetat extrahiert und der fest ausgefallene Anteil damit gelöst. Die vereinigten Essigester-Lösungen wurden mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung, H₂O und NaCl-Lösung intensiv ausgeschüttelt, getrocknet über Natriumsulfat und eingeengt zu einem Öl. Aus Essigester/Äther/Petroläther erhielt man ein gallertiges Produkt. Es wurde aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 21 g (74,5 %) Fp. 150-52°C

$[\alpha]_D^{24} = - 37,6$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

C₂₆H₃₉N₅O₉ (565,6)

Ber. C 55,21 H 6,95 N 12,38

Gef. C 55,43 H 7,04 N 12,60

Boc-Ala-Gln(Pmb)-Ile-ONB

11 g Gln(Pmb)-Ile-ONB x HCl (0,02 Mol) und 6,2 g Boc-Ala-ONp (0,02 Mol) wurden in 100 ml DMF gelöst und mit 2,8 ml TAA versetzt. Dabei fiel TAA x HCl aus. Nach 24 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur goß man in ges. NaCl-Lösung ein. Das feste Produkt wurde abfiltriert, mit Wasser auf dem Filter gewaschen, getrocknet und umkristallisiert aus Äthanol/Petroläther und Äthanol/Wasser.

Ausbeute: 12 g (90 %) Fp. 150-52°C

$[\alpha]_D^{24} = - 27,5$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{34}H_{47}N_5O_{10}$ (685,8)

Ber. C 59,54 H 6,91 N 10,21

Gef. C 58,87 H 6,87 N 10,22

Ala-Gln-Ile-ONB x TFA

14 g (0,025 Mol) Boc-Ala-Gln-Ile-ONB wurden eine halbe Stunde lang mit Trifluoressigsäure unter Feuchtigkeitsausschluß stehen gelassen. Nach Einengen i.V. wurde mit abs. Äther versetzt und gut durchgeknetet. Der Äther wurde dekantiert und der Rückstand aus Methanol vorsichtig mit Äther gefällt. Das Produkt ist gallertig, ließ sich aber gut absaugen.

Ausbeute: 11,8 g (84 %) Fp. 158-60°C

$[\alpha]_D^{24} = -15,3$ (c = 1, Methanol)

$C_{23}H_{32}F_3N_5O_9$ (579)

Die Abspaltung des Boc-Restes mit 4 N HCl/Dioxan führte zu einem Produkt, das sich durch Verreiben mit Äther zwar in fester Form erhalten ließ, das jedoch nicht umkristallisierbar war.

Ala-Gln(Pmb)-Ile-ONB x HCl

13,7 g Boc-Ala-Gln(Pmb)-Ile-ONB (0,02 Mol) wurden mit 100 ml 4 N HCl/Dioxan übergossen. Nach einer halben Stunde stehen unter Feuchtigkeitsausschluß wurde eingeengt und der ölige Rückstand aus Methanol/Äther/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 11,5 g (93 %) Fp. 166-68°C

$[\alpha]_D^{24} = -8,6$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II einheitlich

$C_{29}H_{40}Cl N_5O_8$ (622,1)

Ber. C 55,99 H 6,48 N 11,25

Gef. C 56,14 H 6,36 N 11,01

Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB

14,5 g (0,05 Mol) Ala-Gln-Ile-ONB x TFA, 10,2 g (0,075 Mol) HOBT und 11 g Boc-Thr (0,05 Mol) wurden in 250 ml DMF gelöst, bei - 10°C zuerst mit 6 ml N-Methylmorpholin (0,05 Mol) neutralisiert und dann mit 11 g DCCI (0,055 Mol) in 50 ml DMF versetzt. Nach Rühren über Nacht, wobei man langsam auf Zimmertemperatur kommen ließ, wurde vom ausgefallenen DC-Harnstoff abgetrennt und die DMF-Lösung in 1200 ml eiskalte Kochsalzlösung eingerührt. Das Peptid fiel als Schmiere aus. Nach Extraktion mit Äthylacetat und dem üblichen Waschen der Lösung wurde erst aus Essigester/Petroläther, dann aus Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 10,8 g (63 %) Fp. 153-55°C

$[\alpha]_D^{24} = - 41,5$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{30}H_{46}N_6O_{11}$ (666,8)

Ber. C 54,04 H 6,96 N 12,60

Gef. C 54,61 H 7,06 N 12,37

Thr-Ala-Gln-Ile-ONB x TFA

6,7 g Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB wurden wie üblich mit TFA von der Boc-Gruppe befreit. Nach Einengen und Verreiben mit abs. Äther erhielt man ein weißes Pulver.

Ausbeute : 6,7 g (98 %) Fp. unscharf ab 50-90°C

$[\alpha]_D^{24} = - 29,2$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{27}H_{39}F_3N_6O_{11}$ (680,6)

Das Produkt wurde ohne Analyse verwendet.

Boc-Thr-Ala-Gln(Pmb)-Ile-ONB

12,4 g Ala-Gln(Pmb)-Ile-ONB x HCl (0,02 Mol), 4,2 g Boc-Thr (0,02 Mol) und 3,9 g HOBt (0,03 Mol) wurden in 120 ml DMF bei - 5°C gelöst, zuerst mit 2,4 ml N-Methylmorpholin (0,02 Mol) und dann mit 5 g DCCI (0,021 Mol) in 30 ml DMF versetzt. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, trennte vom ausgefallenen DC-Harnstoff ab und goß in 1 Liter ges. NaCl-Lösung ein. Das Produkt fiel aus, wurde abgetrennt, in Äthylacetat aufgenommen und diese Lösung mit NaHCO₃-Lösung (5 %ig), Wasser und Kochsalzlösung ausgeschüttelt, getrocknet und eingeeengt. Der feste Rückstand wurde umkristallisiert aus Methanol/Wasser.

Ausbeute: 11,5 g (71 %) Fp. 167-68°C

$[\alpha]_D^{24} = - 32,7$ (c = 1, Methanol)

DC : I, V einheitlich

C₃₈H₅₄N₆O₁₂ (786,9)

Ber. C 58,00 H 6,93 N 10,68

Gef. C 58,37 H 6,99 N 10,73

Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-OH

6,7 g Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB (0,01 Mol) wurden in 150 ml Methanol + 1 ml Eisessig mit Pd/Aktivkohle katalytisch hydriert. Nach Filtrieren und Einengen erhielt man ein Öl, das nach intensivem Verreiben mit abs. Äther fest wurde. Das schlecht absaugbare Produkt wurde über P₂O₅ getrocknet. Es war leicht hygroskopisch und wurde ohne Analyse weiterverarbeitet.

C₂₃H₄₁N₅O₉ (531,6)

Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ (II)

2,66 g (0,005 Mol) Boc-Thr-Ala-Gln-Ile und 2,6 g Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA (0,005 Mol) wurden in 100 ml DMF gelöst unter Zusatz von 1 g HOBt (0,0075). Bei - 5°C gab man zuerst 0,6 ml N-Methylmorpholin (0,005 Mol) und dann 1,1 g (0,0055 Mol) DCCI in 20 ml DMF hinzu und ließ unter Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Nach 3 Std. begannen das Produkt und DC-Harnstoff auszufallen. Schließlich wurde abgesaugt und der Rückstand mehrmals mit Propanol ausgekocht.

Ausbeute: 3,5 g (77 %) Fp. 248-50°

$[\alpha]_D^{24} = -11,2$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

C₄₂H₆₉N₉O₁₁S (908,1)

Ber. C 55,55 H 7,66 N 13,88 S 3,53

Gef. C 56,05 H 7,89 N 13,71 S 3,55

(s.S. 92)

5.2. Sequenz 16-21 (His-Cys-Val-Ala-Thr-Ala)

Z-Thr-Ala-OMe

50,6 g Z-Thr (0,2 Mol) und 28 g Ala-OMe x HCl (0,2 Mol) wurden in 750 ml Methylenchlorid suspendiert, bei 0°C gab man 28 ml (0,2 Mol) TAA zu und dann 41 g (0,2 Mol) DCCI. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, saugte vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, wusch die org. Phase mit NaHCO₃-Lösung (5 %ig), Citronensäurelösung (5 %ig) und Wasser. Nach Trocknen und Einengen kristallisierte das Produkt aus Essigester/Petroläther. Es wurde umkristallisiert aus Essigester/Petroläther und Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 48 g (70 %) Fp. 126-28°

$[\alpha]_D^{24} = -33,6^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{16}H_{22}N_2O_6$ (338,4)

Ber. C 56,79 H 6,56 N 8,28

Gef. C 56,50 H 6,53 N 8,22

Der Ansatz kann auch in DMF durchgeführt werden. Die Aufarbeitung erfolgt dann durch Eingießen der vom Dicyclohexylharnstoff befreiten DMF-Lösung in kalte ges. NaCl-Lösung. Dabei fällt das Produkt aus. Endausbeute ebenfalls 70 %.

Thr-Ala-OMe x CH_3COOH

33,8 g Z-Thr-Ala-OMe (0,1 Mol) wurden in 250 ml Methanol mit 8 ml Eisessig hydrogenolytisch mit Pd/Aktivkohle als Katalysator gespalten. Nach Filtration und Abziehen des Lösungsmittels wurde das erhaltene Öl sofort weiterverarbeitet, da sonst Cyclisierung eintrat (Cyclo-Thr-Ala, Fp. 248-50°C)

Z-Ala-Thr-Ala-OMe

Das oben erhaltene Öl wurde in 150 ml DMF gelöst und mit 34,4 g Z-Ala-ONp (0,1 Mol) sowie 14 ml TAA (0,1 Mol) versetzt. Nach 24 Std. Stehen bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde das Produkt isoliert durch Eingießen in kalte ges. Kochsalzlösung. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wurde der noch feuchte Filterkuchen in Essigester gelöst, wie üblich mit $NaHCO_3$ -Lösung, Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingengt. Kristallisation erfolgte aus Methanol/Äther/Petroläther.

Ausbeute: 30 g (75 %) Fp. 174-76°

$[\alpha]_D^{24} = -49,5^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{19}H_{27}N_3O_7$ (409,5)

Ber. C 55,23 H 6,65 N 10,26

Gef. C 55,28 H 6,66 N 10,09

Ala-Thr-Ala-OMe x CH_3COOH

40,9 g Z-Ala-Thr-Ala-OMe (0,1 Mol) wurden in 600 ml Methanol + 10 ml Eisessig mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach Abfiltrieren und Einengen zur Trockne wurde in 700 ml kochendem Äthanol unter Zusatz von einigen ml Wasser gelöst und mit Äther bis zur beginnenden Kristallisation versetzt.

Ausbeute: 30 g (90 %) Fp. 176-78°C

$[\alpha]_D^{24} = -21,5$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{13}H_{25}N_3O_7$ (335,4)

Ber. C 46,56 H 7,51 N 12,52

Gef. C 45,80 H 7,52 N 12,07

Z-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

35,5 g Ala-Thr-Ala x CH_3COOH (0,1 Mol) und 37,2 g Z-Val-ONp (0,1 Mol) wurden in 750 ml DMF suspendiert und bei 0°C mit 14 ml TAA (0,1 Mol) versetzt. Dann rührte man 36 Std., wobei nach 8 Std. Zimmertemperatur erreicht wurde. Schließlich goß man die Suspension in 1,5 l Eiswasser, saugte ab, wusch mit Wasser nach und trocknete bei 50°C i.V. über $CaCl_2$. Anschließend wurde mehrfach mit Methanol ausgekocht.

Ausbeute: 41 g (80,7 %) Fp. 242-44°C

$[\alpha]_D^{24} = -15,4$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{24}H_{36}N_4O_8$ (508,6)

Ber. C 56,68 H 7,13 N 11,02

Gef. C 56,70 H 7,21 N 10,41

Z-Val-Ala-Thr-Ala-OH

1,25 g Z-Val-Ala-Thr-Ala-OMe (0,00125 Mol) wurden in 20 ml DMF in der Hitze gelöst, nach Abkühlen auf 40°C wurden innerhalb einer halben Stunde unter Rühren 3 ml 1 N NaOH eingetropft. Nach Zugabe von Wasser fiel ein Produkt aus, das nach chromatographischer Analyse nur zu ca. 20 % verseift war.

Val-Ala-Thr-Ala-OMe x CH₃COOH

10,2 g (0,02 Mol) Z-Val-Ala-Thr-Ala-OMe wurden in 300 ml Methanol/Eisessig (2:1) mit Pd/Aktivkohle decarbobenzoxyliert. Nach Filtrieren und Einengen wurde umkristallisiert aus Methanol/Äther/Petroläther.

Ausbeute: 8 g (84 %) Fp. 178-81°C zers.

$[\alpha]_D^{24} = -48,3$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich

C₁₈H₃₄N₄O₈ (434,5)

Ber. C 49,76 H 7,88 N 12,89

Gef. C 49,21 H 7,77 N 12,76

Boc-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

8,4 g (0,02 Mol) Val-Ala-Thr-Ala-OMe x CH₃COOH und 9,2 g (0,02 Mol) Boc-Cys(MBzl)-ONp wurden in 300 ml DMF von 0°C gelöst und mit 2,8 ml TAA versetzt. Nach 12 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde in 1,2 l Eiswasser eingerührt. Der sich bildende Niederschlag wurde abgetrennt, mit Wasser und 1 N NH₄OH-Lösung gut ausgewaschen und 2mal mit Methanol ausgekocht.

Ausbeute: 11,5 g (82 %) Fp. 237-39°C

$[\alpha]_D^{24} = -27,8$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{32}H_{51}N_5O_{10}S$ (697,9)

Ber.	C 55,07	H 7,37	N 10,03	S 4,59
Gef.	C 54,96	H 7,39	N 9,95	S 4,35

Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe x TFA

14 g (0,02 Mol) Boc-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe wurden eine halbe Stunde lang mit 50 ml Trifluoressigsäure unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Das Peptid ging langsam in Lösung, die sich dabei leicht rötlich färbte. Nach Einengen wurde mit abs. Äther verrieben und das feste weiße Produkt aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 11,5 g (84 %) Fp. 201-03°

$[\alpha]_D^{24} = -38,1$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{29}H_{44}F_3N_5O_{10}S$ (711,7)

Ber.	C 48,94	H 6,23	N 9,84	S 4,52
Gef.	C 48,57	H 6,11	N 9,75	S 4,39

Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

a) Bereitung der Carboxylkomponente:

8,1 g (0,015 Mol) Boc-His- N_2H_3 wurden in 30 ml 2 N HCl gelöst, auf - 5°C abgekühlt und bei dieser Temperatur langsam mit einer Lösung von 2,1 g Natriumnitrit in 15 ml Wasser versetzt. Unter Schütteln hielt man noch 5 Min. bei 0 bis - 5°C, überschichtete dann mit 100 ml gekühltem Essigester und gab 30 ml 50 %ige Kaliumcarbonat-Lösung auf einmal hinzu. Man schüttelte gut durch, trennte die Essigesterphase ab, schüttelte noch 2mal mit Essigester aus und trocknete die vereinigten Essigesterauszüge in der Kälte 10 Min. über Natriumsulfat.

b) Bereitung der Aminkomponente und Kupplung

7,1 g (0,01 Mol) Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe x TFA wurden in 150 ml DMF von - 5°C gelöst und mit 1,4 ml (0,01 Mol) TAA versetzt. Unter Rühren filtrierte man zu dieser Lösung die Essigester-Lösung von Boc-His-azid hinzu. Man rührte 24 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur. Nach 1 Std. begann der Ansatz sich zu trüben. Schließlich wurde der Essigester i.V. abgezogen und die klare DMF-Lösung mit 1 l Äther versetzt, wobei das Produkt ausfiel. Nach einigen Stunden im Eisbad wurde abgesaugt, der Niederschlag mehrfach mit Äther und schließlich mit Wasser gewaschen und i.V. getrocknet. Das Rohprodukt enthielt noch Spuren nicht umgesetzter Aminkomponente. Es wurde umgefällt aus Äthanol/Äther.

Ausbeute: 6,5 g (79 %) Fp. 214-15°C

$[\alpha]_D^{24} = - 31,2$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{38}H_{58}N_8O_{11}S$ (835,0)

Ber. C 54,54 H 7,00 N 13,41 S 3,84

Gef. C 54,08 H 7,05 N 13,13 S 3,77

Aminosäureanalyse:

	His	Cys	Val	Ala	Thr
Ber.	1	1	1	2	1
Gef.	0,98	n.b.	0,98	2,00	0,94

Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

7,1 g (0,01 Mol) Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe x TFA wurden in 250 ml DMF von 0°C gelöst, mit 4,8 g (0,01 Mol) Boc-His(Boc)-ONp sowie 1,4 ml TAA (0,01 Mol) versetzt und 12 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur gehalten. Dann wurde in 1 l kalte ges. NaCl-Lösung eingegossen, wobei das Produkt ausfiel. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wurde in 600 ml heißem Äthanol aufgenommen. Beim Abkühlen fiel das Produkt als Gallerte an. Durch Zugabe von Wasser erreichte man, daß es sich etwas besser absaugen ließ.

Ausbeute: 7,2 g

DC : jeweils 2 Flecken in den Systemen I, II, III, IV, die sowohl Pauly-positiv als auch Ninhydrin- und Chlor/Tolidin-positiv sind. Durch Vergleich mit Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe ergab sich, daß es sich um ein Gemisch von imidazol-geschütztem und -freiem Peptid im ungefähren Verhältnis 2:1 handelte.

$C_{43}H_{66}N_8O_{13}S$ (934)

Boc-His(Tos)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

Die Durchführung der Synthese erfolgte analog zum voranstehenden Peptid aus 5,3 g (0,01 Mol) Boc-His(Tos)-ONp.

Auch hier war im Verlauf der Synthese bzw. Aufarbeitung der Tosylrest z.T. abgespalten worden.

Boc-His(DNP)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

7,1 g (0,01 Mol) Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe x TFA und 4,2 g (0,01 Mol) Boc-His(DNP) wurden in 100 ml DMF gelöst und bei - 5°C zuerst mit 2,1 g (0,015 Mol) HOBt, dann mit 1,2 ml (0,01 Mol) N-Methylmorpholin und schließlich mit 2,2 g DCCI (0,012 Mol) in 20 ml DMF versetzt. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, filtrierte den ausgefallenen DC-Harnstoff ab und goß die DMF-Lösung in 1,5 l Äther ein. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen, mit Methanol ausgekocht, abgesaugt und mit Äther und Wasser gewaschen.

Ausbeute: 7,1 g (72 %) Fp. 211-13°

$[\alpha]_D^{24} = -9,6$ (c = 0,5, HMPT)

DC : I, II, III fast einheitlich (gelbe Verunreinigung)

$C_{44}H_{60}N_{10}O_{15}S$ (993,1)

Ber. C 53,22 H 6,09 N 14,10 S 3,23

Gef. C 54,08 H 6,31 N 14,98 S 3,29

Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-N₂H₃

4,2 g Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe (0,005 Mol) wurden in 150 ml DMF gelöst und mit 2,5 ml Hydrazinhydrat (0,05 Mol) 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 8 Stunden begann der Ansatz zu gelieren. Die Aufarbeitung erfolgte durch Eingießen in 800 ml Eiswasser, Einstellen auf pH 7, Kochsalzzugabe und Absaugen des feinen Niederschlags. Nach intensivem Waschen mit Wasser wurde über H₂SO₄ i.V. getrocknet. Dabei fiel das Produkt rein an. Ein Auskochen oder Auswaschen mit Methanol führte zu einem nicht mehr absaugbaren gequollenen gelee-artigen Produkt.

Ausbeute: 3,5 g (84,3 %) Fp. 220-22°

$[\alpha]_D^{24} = -23,4^\circ$ (c = 0,5, HMPT)

DC : I, II, III Spuren vom entspr. Peptidester

$C_{37}H_{58}N_{10}O_{10}S$ (x H₂O) (853,0)

Ber. C 52,10 H 7,09 N 16,41 S 3,75

Gef. C 52,03 H 7,21 N 15,99 S 3,89

Durch Umsetzung von Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe oder Boc-His(Tos)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe mit Hydrazinhydrat in DMF erhielt man jeweils dasselbe Peptidhydrazid mit Imidazol-freiem Histidin. Das gleiche gilt für Boc-His(DNP)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe. Durch Abspaltung der Imidazol-Schutzgruppe färbte sich der Ansatz tiefrot. Durch Waschen mit Methanol wurde das Produkt jedoch auch hier schließlich farblos erhalten.

Boc-Cys(SET)-Val-Ala-Thr-Ala-OMe

Aus 5 g Boc-Cys(SET)-DCHA (0,011 Mol) wurde durch Behandlung mit Äthylacetat/Citronensäure die freie Verbindung hergestellt und zusammen mit 4,4 g Val-Ala-Thr-Ala-OMe x TFA (0,01 Mol) in 100 ml DMF gelöst. Bei -10°C gab man erst 1,2 ml N-Methylmorpholin (0,01 Mol) und dann 2,2 g DCCI (0,011 Mol) in 20 ml DMF hinzu. Nach Rühren über Nacht - wobei der Ansatz auf Zimmertemperatur kam - wurde DC-Harnstoff abgetrennt und in 1 l Eiswasser gegossen. Das ausgefallene Produkt wurde gesammelt, gewaschen mit H₂O und aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4,1 g (64 %) Fp. 221-22°C

$[\alpha]_D^{24} = -57,4$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III fast einheitlich

C₂₆H₄₇N₅O₉S₂ (637,8)

Ber. C 48,96 H 7,43 N 10,98 S 10,21

Gef. C 48,12 H 7,31 N 10,58 S 10,55

Boc-Thr-Ala-ONB

80 g Boc-Thr-DCHA (0,2 Mol), 60,8 g Ala-ONB x HBr (0,02 Mol) und 35 g HOBT (0,25 Mol) wurden in 800 ml DMF suspendiert und bei 0°C mit 44 g DCCI (0,21 Mol) versetzt. Man ließ unter Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, saugte vom Ungelösten ab, goß in 2 l eiskalte NaCl-Lösung und extrahierte das ausfallende Öl mit Essigester. Anschließend wurde die Essigester-Lösung mit NaHCO₃-Lösung, KHSO₄-Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und aus Essigester/Petroläther kristallisiert und umkristallisiert.

Ausbeute: 73 g (87 %) Fp. 119-21°C

$[\alpha]_D^{24} = -27,0$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{19}H_{27}N_3O_8$ (425,5)

Ber. C 53,63 H 6,40 N 9,88

Gef. C 53,21 H 6,58 N 9,96

Der Ansatz aus Boc-Thr mit N-Methylmorpholin als Base lieferte bei gleicher Aufarbeitung dasselbe Produkt in einer Ausbeute von 96 %.

Thr-Ala-ONB x HCl

42,5 g Boc-Thr-Ala-ONB (0,1 Mol) wurden mit 200 ml 4 N HCl/Dioxan eine halbe Stunde lang behandelt. Nach Einengen verblieb ein schaumiges Produkt, das über KOH/ P_2O_5 getrocknet wurde.

Boc-Ala-Thr-Ala-ONB

Das oben erhaltene Produkt wurde in 300 ml DMF gelöst, mit 31 g Boc-Ala-ONp (0,1 Mol) und 14 ml (0,1 Mol) TAA versetzt und 24 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur gehalten. Dann wurde in 1,5 l eiskalte ges. NaCl-Lösung eingerührt und das sich abscheidende Öl mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wurde mit 5 %iger $NaHCO_3$ -Lösung, Wasser und ges. NaCl-Lösung extrahiert, getrocknet und eingeeengt. Das resultierende Öl kristallisierte aus Äthanol/Wasser. Es wurde umkristallisiert aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 42 g (83 %) Fp. 86-88°C

$[\alpha]_D^{24} = -41,7^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VII einheitlich

$C_{22}H_{32}N_4O_9$ (496,5)

Ber. C 53,22 H 6,50 N 11,29

Gef. C 53,39 H 6,65 N 11,04

Ala-Thr-Ala-ONB x HCl

25 g Boc-Ala-Thr-Ala-ONB (0,05 Mol) wurden mit 200 ml 4 N HCl/Dioxan übergossen. Nach 10 Min. begann das Produkt auszufallen. Man ließ noch eine halbe Stunde stehen und zog dann das Dioxan i.V. ab. Der Rückstand wurde aus Äthanol/Äther/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 20,5 g (95 %) Fp. 134-36°C

$[\alpha]_D^{24} = -29,2$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{17}H_{25}Cl N_4O_7$ (432,9)

Ber. C 47,17 H 5,82 N 12,95

Gef. C 46,84 H 5,72 N 12,81

Boc-Val-Ala-Thr-Ala-ONB

22 g Ala-Thr-Ala-ONB x HCl (0,05 Mol), 11 g Boc-Val (0,05 Mol) und 10,5 g HOBt (0,075 Mol) wurden in 500 ml DMF aufgeschlämmt und unter Rühren bei -10°C zuerst mit 6 ml N-Methylmorpholin (0,05 Mol) und dann mit 12 g DCCI (0,052 Mol) in 50 ml DMF versetzt ohne Rücksicht darauf, daß keine klare Lösung entstand. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, filtrierte dann vom ausgefallenen Harnstoff ab und goß in 1,5 l eiskalte NaCl-Lösung. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und aus Äthanol/Wasser, Essigester und wieder Äthanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 25 g (83 %) Fp. 168-70°C

$[\alpha]_D^{25} = -51,3$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{27}H_{41}N_5O_{10}$ (595,7)

Ber. C 54,45 H 6,94 N 11,76

Gef. C 53,98 H 7,02 N 11,68

Boc-Val-Ala-Thr-Ala-OH

12 g Boc-Val-Ala-Thr-Ala-ONB (0,02 Mol) wurden in Methanol mit Pd/Aktivkohle in die freie Peptidsäure überführt. Nach Einengen und Aufnehmen in Äthanol wurde das Produkt mit Petroläther langsam ausgefällt. Es bildete sich ein flockiger Niederschlag, der nach dem Absaugen gelb bis braun aussah (durch anhaftenden p-Aminotoluol bzw. seine Oxydationsprodukte). Zur Reinigung wurde in 150 ml 5 %iger NaHCO_3 -Lösung aufgenommen, diese mit Äthylacetat 3 x extrahiert und dann vorsichtig bei 0°C mit KHSO_4 (5 %ig) angesäuert. Dabei fiel das Produkt aus. Es wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 6,6 (72 %) Fp. $134-37^\circ$

$[\alpha]_D^{24} = -9,4$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III, V einheitlich

$\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_8$ (460,5)

Ber. C 52,16 H 7,88 N 12,16

Gef. C 51,87 H 8,05 N 11,70

Val-Ala-Thr-Ala-OH x TFA

4,6 g Boc-Val-Ala-Thr-Ala (0,01 Mol) wurden mittels 20 ml TFA wie üblich deacyliert. Nach Einengen und Verreiben mit abs. Äther hinterblieb ein weißes Produkt. Es wurde zur Reinigung mit Aceton ausgekocht.

Ausbeute: 4,5 g (94 %) Fp. $197-99^\circ$ zers.

$[\alpha]_D^{24} = -55,7$ (c = 1, H_2O)

DC : I, II, III einheitlich

$\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_8$ (474,5)

Ber. N 11,81

Gef. N 11,58

Boc-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OH

4,7 g Val-Ala-Thr x TFA (0,01 Mol) löste man in 100 ml DMF, dann gab man bei 0°C langsam 2,8 ml TAA (0,02 Mol) unter Rühren hinzu. Dabei fiel das Tetrapeptid in Form einer gelatinösen Masse aus. Man brachte es durch Zugabe von einigen ml Wasser wieder in Lösung. Dann gab man 4,6 g Boc-Cys(MBzl)-ONp (0,01 Mol), gelöst in 25 ml DMF hinzu. Dabei fiel der eingesetzte p-Nitrophenylester zum Teil wieder aus. Es wurde zunächst im Eisbad gerührt, nach 1-2 Std. gab man erneut so viel DMF hinzu bis eine klare Lösung entstand. Dann ließ man unter Rühren auf Zimmertemperatur kommen und rührte anschließend noch 24 Std. weiter. Schließlich wurde der Ansatz in 1 l Eiswasser gegossen, mit KHSO_4 -Lösung auf pH 3,5 gebracht und das ausfallende Produkt abgesaugt und mit H_2O neutral gewaschen. Das noch feuchte Material wurde erst aus Äthanol, dann aus DMF/Äthanol umgefällt. Die angegebene Ausbeute wurde nur erreicht, wenn die Komponenten des Ansatzes gelöst waren.

Ausbeute: 5,4 g (79 %) Fp. 216-17°

$[\alpha]_D^{24} = -21,4$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$ (683,8)

Ber. C 54,45 H 7,22 N 10,24 S 4,68

Gef. C 53,61 H 7,04 N 10,06 S 4,63

Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-x TFA

6,8 g Boc-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala wurden mittels 50 ml TFA entacyliert. Nach Einengen und Verreiben mit abs. Äther erhielt man das Peptid Trifluoracetat als weißes Pulver. Es konnte aus Äthanol/Äther umgefällt werden, fiel dabei aber zunächst gallertig an. Durch Waschen mit Äther erhielt man schließlich ein lockeres Pulver.

Ausbeute: 6,5 g (94 %) Fp. 197-99°

$[\alpha]_D^{24} = -32,5$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III, IV einheitlich

$C_{28}H_{42}F_3N_5O_{10}S$ (697,7)

Ber. N 10,00 S 4,59

Gef. N 10,12 S 4,86

Boc-His(Boc)-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-OH

10,5 g Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala x TFA (0,015 Mol) wurden in 200 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 4,2 ml TAA erhielt man einen gallertigen Niederschlag, man gab 7,5 g Boc-His(Boc)-ONp (0,016 Mol) in 50 ml DMF hinzu und rührte heftig bei 0°C. Nach 2 Std. gab man soviel H₂O zu, daß eine fast klare Lösung entstand. Man rührte über Nacht bei 0°C und dann noch 24 Std. bei Zimmertemperatur, goß in Eiswasser ein, säuerte auf pH 4 an mit KHSO₄-Lösung und saugte den feinen Niederschlag ab. Nach Trocknen wurde er in heißem DMF gelöst und durch Zugabe von Äthanol und etwas Äther gefällt.

Ausbeute: 10 g

DC : I, II, III, IV, V 2 Banden mit Pauly, Ninhydrin und Chlor-Tolidin, offensichtlich handelte es sich um ein Gemisch aus imidazolfreiem und imidazolgeschütztem Peptid.

$C_{42}H_{64}N_8O_{13}S$ (920)

Aminosäureanalyse:

	His	Cys	Val	Ala	Thr
Ber.	1	1	1	2	1
Gef.	0,99	n.b.	0,97	2,00	0,96

5.3. Sequenz 11-15 (Gln-Ala-Ala-Thr-Gly)

Z-Thr-Gly-OMe

25,3 g Z-Thr (0,1 Mol) und 12,5 g Gly-OMe x HCl (0,1 Mol) wurden in 250 ml Methylenchlorid suspendiert und bei 0°C mit 14 ml TAA (0,1 Mol) und 20 g DCCI (0,1 Mol) in 100 ml Methylenchlorid versetzt. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, filtrierte den ausgefallenen DC-Harnstoff ab, engte ein, nahm den öligen Rückstand in Essigester auf, trennte noch etwas DC-Harnstoff ab und schüttelte mit NaHCO_3 -Lösung (5 %ig), Wasser, KHSO_4 -Lösung (5 %ig) und kalter ges. NaCl-Lösung aus, trocknete, engte ein und kristallisierte aus Essigester/Petroläther und Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 23,5 g (72 %) Fp. 105-106°

$[\alpha]_D^{24} = -12,9$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ (324,3)

Ber. C 55,55 H 6,48 N 8,64

Gef. C 55,18 H 6,44 N 8,60

Thr-Gly-OMe x CH_3COOH

16,2 g Z-Thr-Gly-OMe (0,05 Mol) wurden in 250 ml Methanol unter Zusatz von 4 ml Eisessig mit Pd/Aktivkohle hydrogenolytisch gespalten. Dann engte man ein zu einem Öl, das nach Trocknen über $\text{KOH/P}_2\text{O}_5$ weiterverarbeitet wurde.

Z-Ala-Thr-Gly-OMe

Das oben erhaltene Öl wurde in 300 ml DMF gelöst und mit 17,2 g Z-Ala-ONp (0,05 Mol) sowie 7 ml TAA (0,05 Mol) bei 0°C versetzt. Nach 24-stündigem Stehen im Eisschrank und

24 Std. bei Zimmertemperatur goß man in ges. NaCl-Lösung ein, wobei das Produkt ausfiel. Es wurde abgesaugt, mit H_2O gut gewaschen, getrocknet und aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 17 g (85 %) Fp. 145-147°

$[\alpha]_D^{24} = - 28,4$ (c = 1 Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{18}H_{25}N_3O_7$ (395,4)

Ber. C 54,68 H 6,33 N 10,63

Gef. C 54,22 H 6,35 N 10,49

Die analoge Boc-Verbindung hat folgende physikalische Daten:

$[\alpha]_D^{24} = - 38,7$ (c = 1, Methanol)

Fp. 156-158° (Essigester/Petroläther)

Ala-Thr-Gly-OMe x CH_3COOH
-----2-----

19,75 g Z-Ala-Thr-Gly-OMe (0,05 Mol) wurden in 250 ml Methanol + 5 ml Eisessig mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingeengt und aus Äthanol/Petroläther kristallisiert und umkristallisiert.

Ausbeute: 15 g (94 %) Fp. 159-161°

$[\alpha]_D^{24} = + 0,9$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{12}H_{23}N_3O_7$ (321,3)

Ber. N 13,08

Gef. N 12,96

Ala-Thr-Gly-OMe x TFA (aus Boc-Ala-Thr-Gly-OMe) fiel ölig an.

Z-Ala-Ala-Thr-Gly-OMe

16 g Ala-Thr-Gly-OMe x CH_3COOH (0,05 Mol) und 18,7 g Z-Ala-ONp (0,055 Mol) wurden in 300 ml DMF von 0°C mit 7 ml TAA (0,05 Mol) gelöst. Dann ließ man 12 Std. im Kühlschrank und 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen und goß in Eiswasser ein, wobei das Produkt ausfiel; es wurde abgesaugt, mit 1 N NH_4OH und Wasser gewaschen und nach Trocknen aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 15 g (75 %) Fp. 214-16°C

$[\alpha]_D^{24} = -11,0$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, V einheitlich

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8$ (466,5)

Ber. C 54,07 H 6,48 N 12,01

Gef. C 53,87 H 6,44 N 12,12

Die analoge Boc-Verbindung hat folgende physikalische Daten:

$[\alpha]_D^{24} = -54,5$ (c = 1, Methanol)

Fp. 190-91°C (EtOH/Pae)

Ala-Ala-Thr-Gly-OMe x CH_3COOH

11,7 g Z-Ala-Ala-Thr-Gly-OMe (0,025 Mol) wurden in 200 ml Methanol + 20 ml Eisessig mit Pd/Aktivkohle katalytisch hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingengt und aus Äthanol/Äther kristallisiert und umkristallisiert.

Ausbeute: 8,2 g (90 %) Fp. 232-34°C zers.

$[\alpha]_D^{24} = -31,2$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich, bei manchen Ansätzen eine kleine Nebenbande

$\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_8$ (392,4)

Ala-Ala-Thr-Gly-OMe x TFA (aus Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-OMe):

$$[\alpha]_D^{24} = - 34,5 \quad (c = 1, \text{Methanol})$$

Fp. 85-90°C

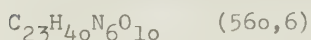
Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-OMe

7,8 g Ala-Ala-Thr-Gly-OMe x CH₃COOH (0,02 Mol) und 7,2 g Boc-Gln-ONp (0,02 Mol) wurden in 50 ml DMF von 0°C und 2,8 ml TAA (0,02 Mol) gelöst. Nach 4 Std. im Eisschrank war der Kolbeninhalt fest, er wurde mit weiteren 50 ml DMF versetzt und die Suspension noch 24 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde mit Äther versetzt, abgesaugt, mit Äther gewaschen und mit Äthanol ausgekocht.

Ausbeute: 8,5 g (76 %) Fp. 221-222°C

$$[\alpha]_D^{24} = - 16,5 \quad (c = 1, \text{DMF})$$

DC : I, II, III einheitlich



Ber. C 49,29 H 7,19 N 14,99

Gef. C 48,56 H 7,03 N 14,91

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ala	Thr	Gly
Ber.	1	2	1	1
Gef.	0,97	2,00	0,98	1,00

Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-N₂H₃

5,6 g Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-OMe (0,01 Mol) wurden in 200 ml warmem DMF gelöst. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur gab man 5 ml Hydrazinhydrat (0,1 Mol) hinzu und rührte 2 Tage bei Zimmertemperatur. Nach 5 Std. begann das Hydrazid auszufallen und nach 1 Tag war der Kolbeninhalt fest. Es wurden

noch 50 ml DMF hinzugefügt und heftig weitergerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit Äther versetzt, abgesaugt und mit Methanol ausgekocht; das Hydrazid ist wasserlöslich.

Ausbeute: 5,3 g (95 %) Fp 210-12°

$[\alpha]_D^{24} = -16,2$ (c = 0,4 DMF)

DC : I, II, III, Ester ist noch nachzuweisen

$C_{22}H_{40}N_8O_9$ (560,6)

Ber. C 47,13 H 7,19 N 19,98

Gef. C 47,07 H 7,22 N 19,81

Z-Gln(DMBH)-Ala-Ala-Thr-Gly-OMe

7,8 g Ala-Ala-Thr-Gly-OMe (0,01 Mol) wurden wie oben mit 6,3 g Z-Gln(DMBH)-ONp (0,01 Mol) in DMF zur Reaktion gebracht.

Nach 2 Std. begann der Ansatz zu gelieren. Durch weitere DMF-Zugabe und heftiges Rühren sorgte man für gute Durchmischung des Kolbeninhalts. Nach 30 Std. wurde mit etwas Äther versetzt, abgesaugt, mit Äther, Methanol und Wasser gewaschen und schließlich mehrmals mit Äthanol ausgekocht. Das Produkt ist schwerlöslich in DMF.

Ausbeute: 6,2 g (75,5 %) Fp. 250°

$[\alpha]_D^{24} = -7,6$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II einheitlich, III kleine Nebenbande

$C_{41}H_{52}N_6O_{12}$ (820,9)

Ber. C 59,99 H 6,38 N 10,23

Gef. C 60,71 H 6,21 N 10,01

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ala	Thr	Gly
Ber.	1	2	1	1
Gef.	1,04	2,00	0,93	0,98

Boc-Thr-Gly-ONB

40 g Boc-Thr-DCHA (0,1 Mol), 29 g Gly-ONB x HBr (0,1 Mol) und 15 g HOBT (0,11 Mol) wurden in 300 ml DMF aufgeschlämmt und bei -10°C mit 22 g DCCI (0,11 Mol) in 100 ml DMF versetzt. Man ließ über Nacht unter Rühren auf Zimmertemperatur kommen, dann wurde der ausgefallene DC-Harnstoff abgetrennt und die DMF-Lösung in 1 l kalte ges. NaCl-Lösung eingerührt. Dabei schied sich ein Öl ab, das mit Äthylacetat extrahiert wurde. Nach Waschen der Essigesterlösung mit 5 %iger NaHCO_3 -Lösung, Wasser und 5 %iger KHSO_4 -Lösung und wieder Wasser wurde getrocknet und eingeeengt und aus Essigester/Petroläther kristallisiert nach 2maligem Abtrennen ausgeschiedener brauner Schmierer.

Ausbeute: 21 g (76 %) Fp. $86-88^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -13,0$ (c = 1, Methanol)

DC : VI, VII einheitlich

$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$ (411,4)

Ber. C 52,55 H 6,12 N 10,22

Gef. C 52,69 H 6,21 N 10,23

Thr-Gly-ONB x HCl

41,1 g Boc-Thr-Gly-ONB (0,1 Mol) wurden mit 120 ml 4 N HCl/Dioxan übergossen und unter gelegentlichem Umschütteln 30 Min. stehen gelassen. Dann wurde eingeeengt und das zurückgebliebene Öl mit abs. Äther übergossen und durchgerührt bis alles fest geworden war. Dann wurde umkristallisiert aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 34 g (100 %) Fp. $100-103^{\circ}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +3,6$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III, V einheitlich

$C_{13}H_{18}Cl N_3O_6$ (347,8)

Ber. N 12,09

Gef. N 11,98

Boc-Ala-Thr-Gly-ONB

Das oben erhaltene Peptidhydrochlorid (0,1 Mol) wurde in 400 ml DMF von 0°C gelöst, mit 14 ml TAA (0,1 Mol) versetzt und mit 31 g Boc-Ala-ONp (0,1 Mol) 24 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann goß man in 1 l ges. Kochsalzlösung von 0°C ein, extrahierte das anfallende Öl mit Essigester und behandelte die Essigesterlösung wie üblich. Die Kristallisation erfolgte aus Äthanol mit Petroläther.

Ausbeute: 36 g (75 %) Fp. 70-72°

$[\alpha]_D^{24} = -11,3^\circ$ (c = 1, DMF)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{21}H_{30}N_4O_9$ (482,5)

Ber. C 52,27 H 6,26 N 11,62

Gef. C 52,30 H 6,20 N 11,57

Ala-Thr-Gly-ONB x TFA

24,1 g Boc-Ala-Thr-Gly-ONB (0,05 Mol) wurden mit 100 ml TFA übergossen und unter gelegentlichem Umschütteln eine halbe Stunde stehen gelassen. Dann wurde eingeeengt i.V. und der ölige Rückstand mit abs. Äther übergossen. Dabei wurde das Produkt fest. Man kristallisierte aus Äthanol/Äther/Petroläther um.

Ausbeute: 23,5 g (95 %) Fp. 112-14°C

$[\alpha]_D^{24} = -12,4$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{18}H_{23}F_3N_4O_9$ (496,4)

Ber. C 43,55 H 4,67 N 11,28

Gef. C 43,40 H 5,07 N 11,55

Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB

25 g Ala-Thr-Gly-ONB x TFA (0,05 Mol) und 16,5 g Boc-Ala-ONp (0,05 Mol) wurden in 400 ml DMF gelöst und bei 0°C mit 7 ml TAA (0,05 Mol) versetzt. Dann ließ man 24 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen und goß dann den Ansatz in 1 l eiskalte ges. NaCl-Lösung. Dabei fiel das Produkt als Öl an, das rasch durchkristallisierte. Es wurde abgesaugt, mit H₂O gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 25 g (90 %) Fp. 186-87°C

$[\alpha]_D^{24} = -15,2$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{24}H_{35}N_5O_{10}$ (553,3)

Ber. C 52,04 H 6,33 N 12,66

Gef. C 51,98 H 6,41 N 12,56

Ala-Ala-Thr-Gly-ONB x TFA

11 g Boc-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB (0,02 Mol) wurden mit 60 ml TFA übergossen, nach 30 Min. wurde eingeeengt und aus Methanol/Äther/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 9,5 g (90 %) Fp. 129-31°C

$[\alpha]_D^{24} = -27,7$ (c = 1, Methanol)

$C_{21}H_{28}F_3N_5O_{10}$ (567,5)

Ber. C 44,27 H 4,98 N 12,34

Gef. C 43,91 H 5,34 N 11,87

Z-Gln(DMBH)-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB

6,3 g Z-Gln(DMBH)-ONp (0,01 Mol) und 5,7 g Ala-Ala-Thr-Gly-ONB x TFA (0,01 Mol) wurden in 150 ml DMF von 0°C gelöst, mit 1,4 ml TAA (0,01 Mol) versetzt und bei 0°C stehen gelassen. Nach einer halben Stunde begann der Ansatz gallertig zu werden, nach 4 Std. war der Kolbeninhalt gallertig-fest. Dann gab man weitere 100 ml DMF hinzu und rührte noch 24 Std., wobei man langsam auf Zimmertemperatur kommen ließ. Der Filterkuchen wurde mit Äthanol ausgekocht, nach dem Abkühlen wurde abgesaugt, getrocknet und das Produkt in heißem DMF gelöst und dann langsam mit H₂O versetzt. Der sich dabei bildende Niederschlag wurde nach dem Abkühlen abgesaugt, mit Aceton und Äther gewaschen und getrocknet. Man erhielt ein lockeres weißes Pulver.

Ausbeute: 7,9 g (82 %) Fp. 233-34°C

$[\alpha]_D^{24} = -7,0$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III eine kleine Nebenbande

C₄₉H₅₉N₇O₁₄ (970,4)

Ber. C 60,65 H 6,16 N 10,10

Gef. C 60,02 H 6,22 N 10,43

Gln(DMBH)-Ala-Ala-Thr-Gly-OH

1,9 g Z-Gln(DMBH)-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB (0,002 Mol) wurden in 200 ml DMF mit PdO₂ als Katalysator hydriert. Die Substanz war zunächst ungelöst, dann trat im Verlauf der H₂-Aufnahme kurzzeitig Lösung ein und dann fiel das Produkt aus. Zu diesem Zeitpunkt war fast die theoretische Menge H₂ aufgenommen worden. Man brachte das Produkt durch Zugabe von Wasser wieder in Lösung und hydrierte zu Ende. Dann wurde i.V. eingengt, wobei das Produkt aus der zurückbleibenden DMF-Lösung ausfiel. Es wurde abgetrennt, mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet. Das Produkt löste sich nicht mehr in DMF,

Wasser und DMF/Wasser (1:1).

Ausbeute: 1,1 g (84,5 %) Fp. 216-18°C

$[\alpha]_D^{24} = -44,6^\circ$ (c = 0,5; 0,1 N NaOH)

DC : I, II, III eine kleine Nebenbande

$C_{31}H_{43}N_6O_{10}$ (659,7)

Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-CNB

15,9 g Ala-Ala-Thr-Gly-ONB x TFA (0,03 Mol) und 11 g Boc-Gln-ONp wurden in 250 ml DMF von 0°C gelöst. Dann gab man 4,2 ml TAA (0,03 Mol) hinzu, ließ 12 Std. im Eisschrank und 12 Std. bei Zimmertemperatur stehen und goß dann in 1,5 l ges. NaCl-Lösung ein. Nach einigen Stunden Stehen lassen im Eisbad wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und der noch feuchte Rückstand aus Äthanol mit Petroläther kristallisiert und aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 15,6 g (76 %) Fp. 193-95°C

$[\alpha]_D^{24} = -16,8$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{29}H_{43}N_7O_{12}$ (681,7)

Ber. C 51,10 H 6,35 N 14,39

Gef. C 51,22 H 6,26 N 14,22

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ala	Thr	Gly
Ber .	1	2	1	1
Gef .	0,96	2,00	0,94	1,00

Boc-Gln(Pmb)-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB

13,3 g (0,025 Mol) Ala-Ala-Thr-Gly-ONB x TFA, 9,2 g (0,025 Mol) Boc-Gln(Pmb) und 5,5 g HOBt (0,04 Mol) wurden bei -10°C in 200 ml DMF gelöst, mit 3 ml N-Methylmorpholin (0,025 Mol) und anschließend mit 5,5 g (0,026 Mol) DCCI in 50 ml DMF versetzt. Man rührte im Eisbad weiter und ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, trennte den ausgefallenen DC-Harnstoff ab und goß in 1 l Eiswasser ein. Dabei fiel das Produkt aus, es wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und der noch feuchte Filterkuchen aus Äthanol umkristallisiert (2mal).

Ausbeute: 17,5 g (87,5 %) Fp. $169-72^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -30,5$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III, V einheitlich

$\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_{13}$ (801,9)

Ber. C 55,42 H 6,41 N 12,22

Gef. C 54,60 H 6,58 N 12,03

Boc-Gln(Pmb)-Ala-Ala-Thr-Gly-OH

8 g Boc-Gln(Pmb)-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB (0,01 Mol) wurden in 300 ml heißem Methanol gelöst mit 2 ml Eisessig versetzt und mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme und Filtrieren wurde eingeengt, die gelbbraune Lösung in 100 ml 5 %iger NaHCO_3 -Lösung aufgenommen, 3mal mit Äthylacetat extrahiert und die wässrige Lösung anschließend vorsichtig mit KHSO_4 -Lösung auf pH 4 gebracht. Dabei fiel die Peptidsäure als käsiger voluminöser Niederschlag aus. Er wurde abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen.

Ausbeute: 4,2 g (61 %) Fp. $184-85^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -36,5$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, V eine kleine Nebenbande

$C_{30}H_{46}N_6O_{11}$ (666,8)

Ber. C 54,04 H 6,95 N 12,60

Gef. C 53,43 H 7,00 N 12,37

5.4. Sequenz 5-10 (Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly)

Z-Val-Gly-OMe

12,5 g Z-Val (0,05 Mol) und 6,25 g Gly-OMe x HCl (0,05 Mol) wurden in 100 ml Chloroform eingerührt, bei 0°C mit 7 ml TAA (0,05 Mol) und 10,1 g DCCI (0,05 Mol) in 50 ml Chloroform versetzt. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, filtrierte vom ausgefallenen DC-Harnstoff ab, engte ein und nahm den Rückstand in Essigester auf. Diese Lösung wurde wie üblich mit 5 %iger $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen und Einengen wurde aus Essigester/Petroläther kristallisiert und aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 13 g (81 %) Fp. 156-157°C

$[\alpha]_D^{24} = -25,4$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{16}H_{22}N_2O_5$ (322,4)

Ber. C 59,61 H 6,88 N 8,68

Gef. C 59,49 H 6,82 N 8,78

Durch Umsatz von Z-Val-ONp mit Gly-OMe x HCl in DMF und TAA als Base erhielt man in 80 %iger Ausbeute ein Produkt vom Fp. 158-159°C. Die Isolierung des Produktes erfolgte hierbei durch Eingießen des Ansatzes in Eiswasser, wobei das Peptid ausfiel.

Val-Gly-OMe x CH₃COOH

32,2 g Z-Val-Gly-OMe (0,1 Mol) wurden in 500 ml Methanol unter Zusatz von 10 ml Eisessig katalytisch hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingeeengt zu einem Öl, das 2 Std. lang über KOH/P₂O₅ getrocknet wurde.

DC : I, II, III einheitlich

Z-Phe-Val-Gly-OMe

Obiges Peptid-Acetat (0,1 Mol) wurde in 150 ml DMF gelöst und bei 0°C mit 42 g Z-Phe-ONp (0,1 Mol) sowie 14 ml TAA (0,1 Mol) versetzt. Man rührte 24 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur. Der Ansatz begann nach ca. 2 Std. teilweise fest zu werden. Zur vollständigen Isolierung des Peptids wurde in Eiswasser eingegossen. Man filtrierte ab, wusch gut mit Wasser und kristallisierte 2mal aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 42 g (90 %) Fp. 193-195°C

$[\alpha]_D^{24} = -33,0$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

C₂₅H₃₁N₃O₆ (469,6)

Ber. C 63,94 H 6,65 N 8,94

Gef. C 63,92 H 6,74 N 8,88

Phe-Val-Gly-OMe x HBr

23,5 g Z-Phe-Val-Gly-OMe (0,05 Mol) wurden mit 150 ml 2 N HBr in Eisessig übergossen. Unter gelegentlichem Umschütteln wurde 1 Std. stehen gelassen unter Feuchtigkeitsausschluß. Dann engte man ein, vertrieb den Rückstand mit abs. Äther, saugte ab und kristallisierte aus Äthanol/Petroläther/Äther.

Ausbeute: 20,3 g (89 %) Fp. 197-99°C

$[\alpha]_D^{24} = -16,9^\circ$

DC : I, II, III, IV einheitlich

$C_{17}H_{26}BrN_3O_4$ (416,3)

Ber. N 10,09

Gef. N 10,18

Z-Ser-Phe-Val-Gly-OMe

12 g Z-Ser (0,05 Mol), 12 g Phe-Val-Gly-OMe x HBr (0,05 Mol) und 10 g HOBT (0,075 Mol) wurden in 300 ml DMF gerührt. Bei -10°C gab man erst 6 ml N-Methylmorpholin (0,05 Mol) und dann 11 g DCCI (0,051 Mol) in 50 ml DMF zu. Man rührte im Eisbad weiter, ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, trennte vom ausgefallenen DC-Harnstoff ab und goß in 1,5 l eiskalte NaCl-Lösung ein. Dabei fiel das Produkt aus. Es wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Man nahm in heißem Essigester auf, schüttelte mit $NaHCO_3$ -Lösung, $KHSO_4$ -Lösung und Wasser aus, trocknete und engte ein. Die Kristallisation erfolgte aus Äthanol.

Ausbeute : 21 g (74 %) Fp. 213-16°C

$[\alpha]_D^{24} = -14,1$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{28}H_{36}N_4O_8$ (556,6)

Ber. C 60,42 H 6,52 N 10,07

Gef. C 60,38 H 6,58 N 10,00

Ser-Phe-Val-Gly-OMe x CH_3COOH

5,6 g (0,01 Mol) Z-Ser-Phe-Val-Gly-OMe wurden wie üblich in 200 ml Methanol unter Zusatz von Eisessig mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach der Aufarbeitung hinterblieb ein Sirup, der

nach Äthanol-Zugabe fest wurde. Es wurde umgefällt aus Äthanol mit etwas Äther.

Ausbeute: 4,3 g (89,5 %) Fp. 155-57°C

$[\alpha]_D^{24} = -7,2$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III eine kleine Nebenbande

$C_{22}H_{34}N_4O_8$ (482,5)

Ber. N 11,61

Gef. N 11,44

Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe

7,6 g Boc-Gln-ONp (0,02 Mol) und 9,6 g Ser-Phe-Val-Gly-OMe x HAc (0,02 Mol) wurden in 150 ml DMF gelöst. Bei 0°C gab man 2,8 ml TAA hinzu, rührte 12 Std. im Eisbad und 20 Std. bei Zimmertemperatur weiter. Nach 3 Std. begann der Kolbeninhalt zu gelieren. Es wurde noch DMF zugegeben und weiter gerührt. Schließlich gab man etwas Äther hinzu, saugte ab, wusch gut mit 1 N NH_4OH - Lösung und Wasser und kochte anschließend mehrmals mit Methanol aus.

Ausbeute: 11 g (84 %) Fp. 222-24°C

$[\alpha]_D^{24} = -13,8$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{30}H_{46}N_6O_{10}$ (650,8)

Ber. C 55,37 H 7,12 N 12,91

Gef. C 55,21 H 7,05 N 12,66

Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe x TFA

6,5 g Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe (0,01 Mol) wurden wie üblich mit TFA deacyliert. Nach Einengen wurde der ölige Rückstand mit Äther verrieben, abgesaugt, mit Äther gewaschen

und 2 Std. über P_2O_5/KOH getrocknet.

Ausbeute: 6,5 g (100 %) Fp. 172-74°

DC : I, II einheitlich, III eine sehr kleine Nebenbande,
wahrscheinlich Pyroglutaminsäure-
peptid.

$C_{27}H_{39}F_3N_6O_{10}$ (664,6)

Das Produkt wurde sofort weiterverarbeitet.

Z-Glu(OBut)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe

4,6 g (0,01 Mol) Z-Glu(OBut)-ONp wurden zusammen mit 6,6 g
(0,01 Mol) Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe in 150 ml DMF unter
Zusatz von 1,4 ml TAA (0,01 Mol) gelöst. Unter Rühren ließ
man langsam von 0°C auf Zimmertemperatur kommen; nach 3 Std.
begann das Produkt gallertig auszufallen. Zur Aufarbeitung
wurde in Äther eingerührt, abgesaugt mit 1 N NH_4OH und Wasser
gewaschen und mit Methanol ausgekocht. Das Peptid ist in DMF
sehr schwer löslich.

Ausbeute: 7 g (80 %) Fp. 198-200°C

$[\alpha]_D^{24} = -16,6$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{42}H_{59}N_7O_{13}$ (870,0)

Ber. C 57,98 H 6,83 N 11,27

Gef. C 57,01 H 6,82 N 11,12

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ser	Phe	Val	Gly
Ber.	2	1	1	1	1
Gef.	2,07	0,88	1,00	1,00	1,00

Z-Glu(Obut)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-N₂H₃

8,7 g Z-Glu(Obut)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OMe (0,01 Mol) wurden in 250 ml DMF heiß gelöst. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur (die Lösung wurde dabei trübe) wurden 5 ml Hydrazinhydrat (0,1 Mol) hinzugefügt und heftig gerührt. Nach 5-6 Std. wurde der Kolbeninhalt puddingartig halbfest. Nach 2 Tagen wurde in Eiswasser eingerührt, abgesaugt und mit Methanol ausgekocht. Das Peptidhydrazid quoll in Methanol stark, es wurde abzentrifugiert und über CaCl₂ bei 40°C getrocknet.

Ausbeute: 7,9 g (91 %) Fp. 240°C

$[\alpha]_D^{24} = -7,6$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III nicht einheitlich, Ester ist noch
nachzuweisen

C₄₁H₅₉N₉O₁₂ (870,0)

Ber. C 56,60 H 6,83 N 14,48

Gef. C 57,22 H 6,65 N 13,98

Z-Ser(Obut)-Phe-Val-Gly-OMe

24 g Z-Ser(Obut)-DCHA (0,05 Mol), 21 g Phe-Val-Gly-OMe x HBr (0,05 Mol) und 10 g HOBt (0,075 Mol) wurden in 300 ml DMF suspendiert und gerührt. Bei -10°C gab man 11 g (0,051 Mol) DCCI in 50 ml DMF hinzu. Nach Rühren über Nacht, wobei man auf Zimmertemperatur kommen ließ, wurde der Harnstoff abgesaugt, die DMF-Lösung in 1,5 l eiskalte NaCl-Lösung gegeben, wobei das Produkt ausfiel. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wurde 2 x aus Äthanol kristallisiert.

Ausbeute: 24,5 g (80 %) Fp. 200-202°C

$[\alpha]_D^{24} = -12,6$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

C₃₂H₄₄N₄O₈ (612,7)

Ber. C 62,74 H 7,23 N 9,14

Gef. C 62,61 H 7,11 N 9,11

Ser(OBut)-Phe-Val-Gly-OME x CH₃COOH

6,1 g Z-Ser(OBut)-Phe-Val-Gly-OME (0,01 Mol) wurden in 200 ml Methanol und 1 ml Eisessig mit Pd/Aktivkohle hydrogenolytisch decarbobenzoyliert. Nach Abtrennen des Katalysators wurde eingeeengt und durch Zugabe von Äther und Petroläther gefällt. Umkristallisieren erfolgte aus Methanol/Äther/Petroläther.

Ausbeute: 4,9 g (90 %) Fp. 107-08°C

$[\alpha]_D^{24} = -4,0^\circ$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

C₂₆H₄₁N₄O₈ (537,7)

Ber. N 10,42

Gef. N 10,38

Die Umsetzung dieses Peptids sowohl mit Z-Gln (HOBt/DCCI) als auch mit Z-Gln(DMBH) lieferte nur noch in kochendem DMF lösliche Pentapeptidderivate, deren analytische Kontrolle und Weiterverarbeitung daher nicht durchgeführt wurde.

Z-Val-Gly-ONB

36 g Z-Val-ONp (0,1 Mol) und 29 g Gly-ONB x HBr (0,1 Mol) wurden in 400 ml DMF aufgenommen und mit 14 ml TAA (0,1 Mol) versetzt. Nach 24 Std. bei 0°C und 12 Std. bei Zimmertemperatur wurde in Eiswasser eingegossen. Dabei fiel das Produkt aus. Es wurde umkristallisiert aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 38 g (86 %) Fp. 159-61°C

$[\alpha]_D^{24} = -17,7^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI VII einheitlich

C₂₂H₂₅N₃O₇ (443)

Ber. C 59,59 H 5,64 N 9,48
Gef. C 59,54 H 5,73 N 9,32

Val-Gly-ONB x HBr

44,3 g Z-Val-Gly-ONB (0,1 Mol) wurden mit 200 ml 2 N HBr in Eisessig übergossen und unter gelegentlichem Umschütteln 1 Std. unter Feuchtigkeitsausschluß stehen gelassen. Nach Einengen wurde das resultierende Öl über KOH/P₂O₅ getrocknet. Nach mehreren Wochen trat langsame Kristallisation ein. Umkristallisation erfolgte aus Äthanol/Äther/Petroläther.

Ausbeute: 34 g (87 %) Fp. 180-82°C

$[\alpha]_D^{24} = + 10,9$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich

C₁₄H₂₀Br N₃O₅ (390,2)

Ber. N 10,77

Gef. N 10,61

Z-Phe-Val-Gly-ONB

42 g Z-Phe-ONp (0,1 Mol) und 39 g Val-Gly-ONB x HBr (0,1 Mol) wurden in 500 ml DMF von 0°C gelöst und mit 14 ml TAA (0,1 Mol) versetzt, wobei Triäthylaminhydrochlorid ausfiel. Nach 24 Std. bei 0°C und 12 Std. bei Zimmertemperatur wurde in 1,5 l Eiswasser gegossen, wobei das Produkt ausfiel. Es wurde abgesaugt, gewaschen mit Wasser, 1 N Ammoniaklösung und wieder Wasser und aus Methanol umkristallisiert, wobei auf sehr langsame Abkühlung geachtet werden mußte, da sonst eine nicht filtrierbare Gallerte entstand.

Ausbeute: 54 g (90 %) Fp. 157-60°C

$[\alpha]_D^{24} = - 7,5^{\circ}$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{31}H_{34}N_4O_8$ (590,6)

Ber. C 63,05 H 5,82 N 9,49

Gef. C 63,08 H 5,81 N 9,33

Phe-Val-Gly-ONB x HBr

29,5 g Z-Phe-Val-Gly-ONB (0,05 Mol) wurden mit 150 ml 2 N HBr in Eisessig übergossen und unter Feuchtigkeitsausschluß und gelegentlichem Umschütteln 1 Std. lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen; dann wurde das Lösungsmittel abgezogen und der ölige Rückstand aus Äthanol/Äther zweimal umkristallisiert.

Ausbeute: 46 g (85 %) Fp. 212-15°C

$[\alpha]_D^{24} = -16,9^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{23}H_{29}Br N_4O_6$ (537,4)

Ber. N 10,42

Gef. N 10,38

Boc-Ser-Phe-Val-Gly-ONB

21,6 g Phe-Val-Gly-ONB x HBr (0,04 Mol) und 8,2 g Boc-Ser- wurden in 250 ml DMF aufgeschlämmt und bei - 5°C mit 6,7 g HOBT (0,05 Mol) und 4,8 ml N-Methylmorpholin (0,04 Mol) versetzt. Dazu gab man 8,8 g DCCI (0,044 Mol) in 60 ml DMF von 0°C. Es wurde 8 Std. gerührt, wobei man auf Zimmertemperatur kommen ließ. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen DC-Harnstoffs wurde in kalte ges. NaCl-Lösung eingerührt, wobei das Produkt ausfiel. Es wurde abgesaugt und aus Äthanol/Wasser, Aceton und Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 17 g (65 %) Fp. 175-77°C

$[\alpha]_D^{24} = -35,0^\circ$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{31}H_{41}N_5O_{10}$ (643,7)

Ber. C 57,84 H 6,42 N 10,87

Gef. C 57,81 H 6,33 N 10,62

Ser-Phe-Val-Gly-ONB x TFA

12,8 g Boc-Ser-Phe-Val-Gly-ONB wurden 100 ml TFA gelöst. Nach 30 Min. wurde eingeeengt und das Produkt mit abs. Äther gefällt. Es wurde abgesaugt und ohne Umkristallisation weiterverarbeitet (eine Umkristallisation aus Äthanol/Äther lieferte eine schlecht absaugbare Gallerte).

Ausbeute: 12 g (90 %) Fp. 187-90°C

$[\alpha]_D^{24} = + 3,0^{\circ}$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, V einheitlich

$D_{28}H_{34}F_3N_5O_{10}$ (657,6)

Ber. N 10,65

Gef. N 10,91

Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONB

7,3 g Boc-Gln-ONp (0,02 Mol) und 13,4 g Ser-Phe-Val-Gly-ONB x TFA (0,02 Mol) wurden in 250 ml DMF gelöst und mit 2,8 ml TAA (0,02 Mol) versetzt. Man ließ 24 Std. bei 0°C stehen und anschließend 24 Std. bei Zimmertemperatur. Dabei fiel ein Teil des Produktes aus. Die Fällung wurde durch Zugabe von Eiswasser vervollständigt. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser und 1 N NH_4OH und wieder Wasser wurde das Produkt mit Äthanol ausgekocht. Zur Analyse wurde eine Probe aus viel Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 13 g (84 %) Fp. 212-15°C

$[\alpha]_D^{24} = - 12,8$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III eine kleine Nebenbande

$C_{36}H_{49}N_7O_{12}$ (771,8)

Ber. C 56,03 H 6,39 N 12,70

Gef. C 56,03 H 6,47 N 12,71

Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

7,7 g Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONB wurden in 150 ml DMF suspendiert und bei Zimmertemperatur mit PdO_2 hydriert. Man engte ein, versetzte mit Methanol, filtrierte nach einigen Stunden bei 0° ab und kristallisierte um aus 150 ml Methanol, dem einige ml DMF zugesetzt waren.

Ausbeute: 5,5 g (86 %) Fp. 195-96°C

$[\alpha]_D^{24} = -11,1^\circ$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III bei dickem Auftrag eine kleine Nebenbande

$C_{29}H_{44}N_6O_{10}$ (636,7)

Ber. C 54,70 H 6,96 H 13,21

Gef. C 54,74 H 6,80 H 13,28

Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH x TFA

6,4 g Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH wurden mit 40 ml TFA übergossen und nach 30 Min. wurde die TFA i.V. entfernt und das Peptid-Trifluoracetat mit abs. Äther gefällt.

Ausbeute: 6 g (95 %) Fp. unscharf 89-112°C

$C_{26}H_{37}F_3N_6O_{10}$ (650)

Das Peptid wurde sofort weiterverarbeitet, da nach einigen Tagen eine zusätzliche Ninhydrin-negative Bande im Chromatogramm auftauchte. Nach ca. 4 Wochen betrug der Anteil dieser Komponente schon ca. 40-50 %. Es dürfte sich dabei um das Pyroglutaminsäure-Derivat handeln.

Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

19,5 g Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH x TFA (0,03 Mol) und 14 g Boc-Glu- α -ONp- γ -OBzl (0,033 Mol) wurden in 400 ml DMF von 0°C gelöst. Dann tropfte man unter Rühren 8,4 ml (0,06 Mol) TAA langsam zu. Dabei bildete sich eine gallertige Fällung. 5 bis 6 Std. nach der TAA-Zugabe hatte sich alles wieder gelöst. Man ließ noch 2 Tage bei Zimmertemperatur rühren, goß dann in Eiswasser ein, säuerte mit KHSO_4 -Lösung auf pH 4 an und saugte das ausgefallene Produkt ab. Nach Trocknen wurde umkristallisiert aus DMF mit Methanol.

Ausbeute: 18 g (72 %) Fp. 233-35°C

$[\alpha]_D^{24} =$

DC : I, II, III, IV einheitlich, nur bei dickem Auftrag in
II eine kleine Nebenbande

$\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_{13}$ (856,0)

Ber. C 57,53 H 6,71 N 11,37

Gef. C 58,58 H 6,69 N 11,12

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ser	Phe	Val	Gly
Ber.	2	1	1	1	1
Gef.	2,00	0,94	0,98	0,99	0,99

Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH x TFA

17 g Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH (0,02 Mol) wurden mit 100 ml TFA übergossen, wobei sich nach ca. 10 Min. alles gelöst hatte. Nach 1/2 Std. wurde die TFA i.V. abgezogen und das freie Peptid-Trifluoracetat mit abs. Äther gefällt.

Ausbeute: 17 g (quantitativ) Fp. 193-95°C

$[\alpha]_D^{24} = + 0,8$ (c = 0,5, DMF) Braunfärbung ab 175°C

DC : I, II, III einheitlich

$\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_{13}$ (869,9)

Ber. N 11,27

Gef. N 11,49

Z-Glu(OBut)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

22,7 g (0,035 Mol) Gln-Ser-Phe-Val-Gly x TFA wurden mit 16 g Z-Glu- α -ONp- β -OBut in 300 ml DMF gelöst. Bei 0° wurden dann langsam 9,8 ml TAA (0,07 Mol) zugetropft. Dabei gelierte der Kolbeninhalt. Nach Zugabe von weiteren 100 ml DMF wurde heftig im Eisbad gerührt. Nach ca. 2 Std. entstand eine klare Lösung. Man rührte noch 24 Std. bei Zimmertemperatur weiter, goß in 1,5 l Eiswasser ein, stellte auf pH 4,5, wobei das Produkt ausfiel. Nach Absaugen und Trocknen wurde mit Äthanol ausgekocht und dann aus DMF/Methanol umgefällt. Während das Rohprodukt noch mit Z-Glu- α -ONp- β -OBut verunreinigt war, war die umgefällte Peptidsäure chromatographisch einheitlich; sie ließ sich nur schlecht absaugen.

Ausbeute: 6,5 g (75 %) Fp. 233°C

$[\alpha]_D^{24} = -11,0^\circ$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III, IV eine kleine Nebenbande

$C_{41}H_{57}N_7O_{13}$ (856,0)

Ber. C 57,53 H 6,71 N 11,45

Gef. C 56,92 H 6,96 N 11,73

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ser	Phe	Val	Gly
Ber.	2	1	1	1	1
Gef.	1,97	1,01	1,02	1,08	1,00

Boc-Ser-Phe-Val-Gly-OH

12,8 g (0,02 Mol) Boc-Ser-Phe-Val-Gly-ONB wurden in 200 ml Methanol mit Pd/Aktivkohle hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators und Einengen wurde in Äthanol aufgenommen und

mit Petroläther versetzt. Es bildete sich eine gut absaugbare Fällung, die durch p-Aminotoluol und Oxydationsprodukte gelb bis gelb-braun gefärbt war. Zur Reinigung wurde der getrocknete Niederschlag (9,2 g) in 150 ml 5 %igem wässrigem NaHCO_3 gelöst und die alkal. Lösung 3mal mit Äthylacetat extrahiert. Dadurch ließen sich die gefärbten Verunreinigungen abtrennen. Nach Abkühlen wurde die wässrig-alkal. Lösung vorsichtig mit KHSO_4 (5 %) angesäuert (pH 4), wobei das Produkt ausfiel. Es wurde mit Eiswasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 7,5 g (75 %) Fp. 228-31°, zers. ab 180°C

$[\alpha]_D^{24} = -12,6$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, V einheitlich

$\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7$ (492,6)

Ber. N 11,37

Gef. N 11,59

Eine zweite Fraktion erhielt man durch Sättigen der wässrigen Mutterlauge mit NaCl und Ausschütteln mit Essigester. Das Produkt sammelte sich dabei in fester Form in der Essigester-Phase.

Ser-Phe-Val-Gly-OH x TFA

9,8 g (0,02 Mol) Boc-Ser-Phe-Val-Gly wurden in 50 ml TFA gelöst, nach 30 Min. wurde eingeeengt und mit Äther gefällt. Das Produkt wurde abgesaugt und mit Aceton gewaschen.

Ausbeute: 9,2 g (91 %) Fp. 178-80°C

$[\alpha]_D^{24} = -58,6$ (c = 1, H_2O)

DC : I, II, III einheitlich

$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_7$ (506,5)

Boc-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

15,2 g (0,03 Mol) Ser-Phe-Val-Gly x TFA wurden in 150 ml DMF gelöst und bei 0°C zuerst mit 11,1 g Boc-Gln-ONp (0,03 Mol) und dann mit 8,4 ml TAA (0,06 Mol) versetzt. Dabei wurde die Lösung leicht gallertig trüb. Nach 4 Std. bei 0°C hatte sich alles gelöst. Man rührte über Nacht im Eisbad und dann noch 24 Std. bei Zimmertemperatur. Anschließend goß man in Äther ein. Nach dem Absaugen und Trocknen wurde aus DMF/Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 14 g (77 %) Fp. 196-97°C

$[\alpha]_D^{24} = -11,9$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{29}H_{44}N_6O_{10}$ (626,7)

Z-Ser(OBut)-Phe-Val-Gly-ONB

14,4 g (0,03 Mol) Z-Ser(OBut)-DCHA, 12,8 g (0,03 Mol) Phe-Val-Gly-ONB x HBr und 6,8 g (0,05 Mol) HOBT wurden in 250 ml DMF gerührt und bei -10°C mit einer Lösung von 6,2 g (0,031 Mol) DCCI in 50 ml DMF versetzt. Nachdem über Nacht unter Rühren Zimmertemperatur erreicht war, wurde vom ausgefallenen Harnstoff abgesaugt und die DMF-Lösung in 1,5 l Eiswasser eingegossen, wobei das Produkt ausfiel. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wurde in heißem Essigester aufgenommen, wie üblich gewaschen, getrocknet und eingeengt. Dabei fiel das Peptid aus. Es wurde aus Äthanol/Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 17 g (79 %) Fp. 193-95°C

$[\alpha]_D^{24} = -10,6$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{38}H_{47}N_5O_{10}$ (733,8)

Ber. C 62,20 H 6,46 N 9,54

Gef. C 62,26 H 6,53 N 9,43

Nach Hydrogenolyse erhielt man ein wasserlösliches Peptid, dessen Umsatz mit Z-Gln(DMBH)-ONp in DMF/Wasser zu keinem einheitlichen Produkt geführt hat.

Z-Gln(DMBH)-Ser-Phe-Val-Gly-OH

6,3 g Z-Gln(DMBH)-ONp (0,01 Mol) und 5,2 g Ser-Phe-Val-Gly-OH x TFA (0,01 Mol) wurden in 120 ml kaltem DMF gelöst. Nach Zugabe von 2,8 ml TAA (0,01 Mol) wurde erst im Eisbad (6 Std.), dann 24 Std. bei Zimmertemperatur heftig gerührt. Schließlich goß man in Eiswasser, stellte auf pH 4 ein, saugte ab, trocknete, löste in heißem DMF und versetzte vorsichtig mit Methanol. Das Produkt löste sich nur noch in kochendem DMF.

Ausbeute: 9,9 g (95 %) Fp. 250°C

$[\alpha]_D^{24} = -3,2$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III eine Nebenbande

$C_{47}H_{56}N_6O_{12}$ (897,0)

Ber. N 9,37

Gef. N 9,49

Gln(DMBH)-Ser-Phe-Val-Gly

3,3 g Z-Gln(DMBH)-Ser-Phe-Val-Gly-ONB (0,003 Mol) wurden in 200 ml DMF mittels PdO_2 bei ca. 80°C kat. hydriert. Nach Filtrieren der heißen Lösung wurde mit Methanol versetzt und nach dem Abkühlen abgesaugt und getrocknet.

Das Produkt zeigte im Chromatogramm drei Nebenbanden und ist graugrün gefärbt.

Eine Hydrogenolyse in DMF von Zimmertemperatur gelang nicht.

5.5. Sequenz 1-4 (Val-Lys-Pro-Gly)

Boc-Pro-Gly-ONp

21,5 g (0,1 Mol) Boc-Pro und 26,3 g Gly-ONp x HBr (0,1 Mol) wurden in 400 ml Chloroform aufgeschlämmt und bei -10°C erst mit 14 ml N-Äthylmorpholin und dann mit 0,11 Mol (22 g) DCCI in 100 ml Chloroform versetzt. Dann ließ man unter Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, filtrierte vom DC-Harnstoff ab, engte ein und schlämte den festen Rückstand in Essigester auf und schüttelte mit H_2O , NaHCO_3 (5 %ig) und ges. NaCl aus (das Produkt löste sich in Essigester, N-Äthylmorpholin $\cdot\text{HCl}$ in H_2O). Nach Trocknen und Einengen wurde aus Essigester/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 34 g (86 %) Fp. $146-48^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -67,6$ ($c = 1$, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7$ (393,4)

Ber. C 54,95 H 5,89 N 10,65

Gef. C 54,75 H 6,08 N 10,55

Pro-Gly-ONp x HCl

19,75 g (0,05 Mol) Boc-Pro-Gly-ONp wurden in 100 ml 4 N HCl/Dioxan eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur gehalten, dann das Dioxan abgezogen und der Rückstand (fest) aus Äthanol/Äther kristallisiert.

Ausbeute: 14,5 g (90 %) Fp. $171-74^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -37,6$ ($c = 1$, Methanol)

DC : I, V einheitlich

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{Cl N}_3\text{O}_5$ (329,7)

Ber. C 47,34 H 4,85 N 12,74

Gef. C 46,75 H 4,95 N 12,40

Boc-Lys(Z)-Pro-Gly-ONp

Aus 36,3 g (0,055 Mol) Boc-Lys(Z)-DCHA wurde die freie Verbindung dargestellt durch Verteilen zwischen Äthylacetat und 5 %iger Citronensäure-Lösung und zusammen mit 16,5 g (0,05 Mol) Pro-Gly-ONp x HCl in 400 ml Chloroform aufgeschlämmt, dann gab man bei -10°C erst 7 ml N-Äthylmorpholin und dann sofort 11 g (0,055 Mol) DCCI in 100 ml Chloroform zu. Man ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, saugte den Harnstoff ab, engte ein, nahm in Essigester auf, extrahierte mit H_2O , NaHCO_3 , NaCl-Lösung, engte ein und kristallisierte aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 28 g (90 %) Fp. $134-137^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -73,3$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_{10}$ (654,7)

Ber. C 58,72 H 6,16 N 10,70

Gef. C 58,27 H 6,28 N 10,54

Lys(Z)-Pro-Gly-ONp x HCl

32,7 g Boc-Lys(Z)-Pro-Gly-ONp (0,05 Mol) ließ man 20 Min. in 100 ml 4 N HCl/Dioxan stehen, engte ein und vertrieb den öligen Rückstand mit abs. Äther, dabei wurde er fest.

Ausbeute: 27,5 g (90 %) Fp. $50-60^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -40,9$ (c = 1, Methanol)

$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{Cl N}_5\text{O}_8$ (592,1)

Das Produkt ist hygroskopisch und wurde sofort weiterverarbeitet.

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-ONp

12,5 g (0,05 Mol) Z-Val und 29,7 g (0,05 Mol) Lys-Pro-Gly-ONp x HCl wurden in 700 ml Chloroform gelöst, bei -10°C gab man 6 ml N-Äthylmorpholin, dann 11 g (0,051 Mol) DCCI in 100 ml Chloroform zu, ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, saugte ab, wusch den heißen Niederschlag mit heißem THF (Produkt fiel z.T. aus bei der Reaktion), engte ein, wusch den festen Rückstand mit H_2O aus und kristallisierte aus viel Methanol und aus DMF/Methanol.

Ausbeute: 32 g (84 %) Fp. $190-92^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -43,7$ (c = 1, DMF)

DC : I, II, V einheitlich, in manchen Ansätzen etwas
DC-Harnstoff sichtbar

$\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_{11}$ (787,86)

Ber. C 60,97 H 6,01 N 10,67

Gef. C 60,78 H 6,07 N 10,70

Aminosäureanalyse:

	Val	Lys	Pro	Gly
Ber.	1	1	1	1
Gef.	0,98	0,95	1,02	1,00

Boc-Pro-Gly-ONB

43 g (0,2 Mol) Boc-Pro und 58 g (0,2 Mol) Gly-ONB x HBr wurden in 500 ml Methylenchlorid suspendiert. Man rührte bei -10°C in die Mischung erst 30 ml (0,21 Mol) TAA und anschließend 44 g DCCI (0,22 Mol) in 100 ml Methylenchlorid ein. Nach Rühren über Nacht saugte man vom ausgefallenen DC-Harnstoff ab, engte ein und nahm den Rückstand in 500 ml Essigester auf. Dann wurde wie üblich ausgeschüttelt, getrocknet und eingengt. Die Kristallisation erfolgte aus Äther/Petroläther nach Animpfen. Impfkristalle erhielt man durch Stehenlassen (1 Woche) des öligen Rückstandes unter Petroläther im Eisschrank.

Ausbeute: 72 g (90 %) Fp. 93-94°C

$[\alpha]_D^{24} = -52,5$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{19}H_{25}N_3O_7$ (407,4)

Ber. C 56,01 H 6,18 N 10,31

Gef. C 55,87 H 6,20 N 10,17

Pro-Gly-ONB x HCl

10 g (0,025 Mol) Boc-Pro-Gly-ONB wurden mit 4 N HCl/Dioxan von der Aminoschutzgruppe befreit. Nach Einengen und Aufbewahren des öligen Lösungsmittel-freien Rückstandes 3 Wochen lang über KOH/P₂O₅ begann die Kristallisation. Dann wurde aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 7,7 g (89 %) Fp. 102-05°C

$[\alpha]_D^{24} = -29,4$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{14}H_{18}N_3O_5Cl$ (343,5)

Ber. N 12,22

Gef. N 12,01

Z-Lys(Boc)-Pro-Gly-ONB

17,2 g (0,05 Mol) Pro-Gly-ONB x HCl wurden in 250 ml DMF gelöst, bei 0°C mit 25,5 g Z-Lys(Boc)-ONp und 7 ml TAA versetzt. Dann wurde 24 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt, in 1,5 l ges. kalte NaCl-Lösung eingetragen, das anfallende Öl mit Essigester extrahiert, wie gewöhnlich gewaschen, getrocknet, eingeengt und aus Essigester und Äthanol jeweils durch vorsichtige Zugabe von Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 30 g (89 %) Fp. 86-89°C

$[\alpha]_D^{24} = -57,0$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{33}H_{43}N_5O_{10}$ (669,7)

Ber. C 59,20 H 6,47 N 10,46

Gef. C 58,81 H 6,44 N 10,37

Lys(Boc)-Pro-Gly

3,35 g Z-Lys(Boc)-Pro-Gly-ONB (0,005 Mol) wurden in 100 ml Methanol mit H_2 /Pd/Aktivkohle behandelt. Nach Aufnahme von ca. 400 ml H_2 begann das Produkt auszufallen. Es wurde durch Zugabe von einigen ml H_2O wieder in Lösung gebracht und zu Ende hydriert. Nach Filtrieren und Einengen i.V. hinterblieb ein gelber fester Rückstand, der mit Aceton ausgekocht wurde. Nach dem Abkühlen wurde abgesaugt.

Ausbeute: 1,8 g (90 %) Fp. 198-200°C

$[\alpha]_D^{24} = -47,4$ (c = 1, H_2O)

DC : I, II, III einheitlich

$C_{18}H_{32}N_4O_6$ (400,5)

Ber. N 13,98

Gef. N 13,79

Boc-Val-Lys(Boc)-Pro-Gly-OH

4 g Lys(Boc)-Pro-Gly (0,01 Mol), 3,1 g Boc-Val-OSu (0,01 Mol) und 1,4 ml TAA wurden in 60 ml DMF von 0°C aufgeschlämmt und zur Lösung mit einigen Tropfen H_2O versetzt. Dann ließ man 36 Std. bei Raumtemperatur rühren, engte i.V. ein, säuerte vorsichtig auf pH 4 an und extrahierte die Peptidsäure mit Essigester. Nach Trocknen und Einengen wurde in Äther aufgenommen und auf -20°C gekühlt. Dabei begann das Produkt zu kristallisieren. Durch Petroläther-Zugabe wurde die Kristallisation vervollständigt.

Ausbeute: 4 g (66 %) Fp. 100-104°C

$[\alpha]_D^{24} = -76,2$ (c = 1, Methanol)

DC : I, V, VII eine kleine Nebenbande

$C_{28}H_{49}N_5O_9$ (599,7)

Ber. C 56,08 H 8,06 N 11,67

Gef. C 56,38 H 8,16 N 11,56

Boc-Pro-Gly-OMe

43 g Boc-Pro (0,2 Mol) und 25 g Gly-OMe x HCl (0,2 Mol) wurden in 400 ml Chloroform aufgeschlämmt und gerührt, bei -10°C gab man zuerst 30 ml TAA (0,22 Mol) zu und anschließend 44 g DCCI (0,22 Mol) in 100 ml Chloroform. Man rührte weiter im Eisbad und ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Dann wurde vom ausgefallenen DC-Harnstoff abgetrennt, eingeeengt und das zurückbleibende Öl in Essigester aufgenommen, erneut filtriert und mit Wasser, $NaHCO_3$ -Lösung (5 %ig) und $KHSO_4$ -Lösung (5 %ig) ausgeschüttelt. Nach Einengen wurde in Äther aufgenommen, mit Petroläther kristallisiert und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 50 g (88 %) Fp. 66-67°C

$[\alpha]_D^{24} = -62,6$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII einheitlich

$C_{13}H_{22}N_2O_5$ (286,3)

Ber. C 54,54 H 7,75 N 9,79

Gef. C 54,82 H 7,67 N 9,68

Pro-Gly-OMe x HCl

14,3 g Boc-Pro-Gly-OMe wurden mit 100 ml 4 N HCl in Dioxan entacyliert. Nach Einengen hinterblieb ein Öl, das über KOH/P₂O₅ i.V. getrocknet wurde.

C₈H₁₅Cl N₂O₃ (222,5)

Boc-Lys(Z)-Pro-Gly-OMe

11,1 g Pro-Gly-OMe x HCl (0,05 Mol) wurden in 100 ml DMF gelöst und bei 0°C mit 25 g Boc-Lys(Z)-ONp (0,05 Mol) und 7 ml TAA (0,05 Mol) versetzt. Nach 12 Std. bei 0°C und 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde in 1,2 l eiskalte ges. NaCl-Lösung eingegossen und das sich abscheidende Öl mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wurde sehr sorgfältig wie üblich gewaschen und eingeeengt. Das Produkt kristallisierte nach 6-monatigem Stehen im Eisschrank langsam aus dem Öl. Umkristallisation erfolgte aus Äther/Petrol-äther durch langsames Verdunstenlassen des Äthers nach Animpfen.

Ausbeute: 12,5 g (45 %) Fp. 81-83°C

$[\alpha]_D^{24} = -52,5$ (c = 1, Methanol)

DC : V, VI, VII eine kleine Nebenbande (Boc-Lys(Z)-ONp)

C₂₇H₄₀N₄O₈ (548,6)

Ber. C 59,11 H 7,35 N 10,21

Gef. C 59,47 H 7,49 N 10,48

Lys(Z)-Pro-Gly-OMe x HCl

22 g Boc-Lys(Z)-Pro-Gly-OMe (0,04 Mol) wurden mit 4 N HCl in Dioxan von der Boc-Schutzgruppe befreit. Nach Einengen hinterblieb ein Öl, das nach Trocknen über KOH/P₂O₅ weiterverarbeitet wurde.

Ausbeute: ≈ quantitativ

C₂₂H₃₃Cl N₄O₆ (484,5)

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-OMe

18 g Lys(Z)-Pro-Gly-OMe x HCl (0,04 Mol) wurden in 300 ml DMF von 0°C gelöst, dann gab man 14,4 g Z-Val-ONp (0,04 Mol) und 5,6 ml TAA hinzu, ließ 24 Std. im Kühlschrank und 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen, goß in 1,2 l Eiswasser ein und extrahierte das ölig anfallende Peptid mit Essigester. Nach Trocknen und Einengen wurde 2mal aus Essigester/Petroläther und aus Äthanol/Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 22 g (81 %) Fp. 150-51°C

$[\alpha]_D^{24} = -71,5$ (c = 1, Methanol)

DC : I, V, VII einheitlich

$C_{35}H_{47}N_5O_9$ (681,8)

Ber. C 61,66 H 6,94 N 10,27

Gef. C 61,21 H 6,81 N 10,49

Aminosäureanalyse:

	Val	Lys	Pro	Gly
Ber.	1	1	1	1
Gef.	0,99	0,95	0,99	1,00

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-N₂H₃

6,8 g Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-OMe (0,01 Mol) wurden in 200 ml DMF gelöst, mit 5 ml Hydrazinhydrat (0,1 Mol) versetzt und 3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde in 1 l Eiswasser eingerührt, der pH auf 7-8 eingestellt und das ausgefallene Produkt nach einigen Stunden Stehen im Eis abfiltriert und aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: Fp. 200-201°C

$[\alpha]_D^{24} = -47,7$ (c = 1, Methanol)

DC : I, II, V einheitlich

$C_{34}H_{47}N_7O_8$ (681,8)

Ber. C 59,89 H 6,95 N 14,38

Gef. C 59,52 H 6,84 N 14,17

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-OH

3,4 g Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-OMe (0,005 Mol) wurde in 50 ml warmem Methanol gelöst. Nach Abkühlen wurde mit 5 ml 1 N NaOH verseift (3 Std.). Dann wurde mit 1 N H_2SO_4 neutralisiert, das Methanol abgezogen, mit H_2O versetzt und auf pH 3,5 gebracht. Das ausfallende Öl wurde im Eisbad fest. Aus Methanol/Wasser erhielt man eine sehr schlecht absaugbare gallertige Fällung.

Ausbeute: 2 g (61 %)

DC : I, V einheitlich, bei manchen Ansätzen noch etwas Ester nachweisbar

$C_{34}H_{45}N_5O_9$ (667,7)

Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung zum p-Nitrophenylester umgesetzt.

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-ONp (II)

6,7 g Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-OH (0,01 Mol) und 1,4 g p-Nitrophenol (0,01 Mol) wurden in 200 ml THF gelöst und bei $-10^{\circ}C$ mit 2,2 g (0,011 Mol) DCCI versetzt. Nach Stehen über Nacht bei $0^{\circ}C$ und 2 Std. bei Zimmertemperatur wurde filtriert, eingeeengt und aus Methanol kristallisiert.

Ausbeute: 4,7 g (61 %) Fp. $186-88^{\circ}C$

$[\alpha]_D^{24} = -45,2$ (c = 1, DMF)

DC : V, I einheitlich

$C_{40}H_{47}N_5O_{10}$ (773,9)

s.S. 142

5.6. Versuch zur Synthese von Sequenz 16-27

Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-Met
Lys(Z)-NH₂

1,68 g Boc-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-NH₂ (0,002 Mol) wurden in 20 ml warmem HMPT gelöst, mit 20 ml DMF versetzt und auf - 30°C gekühlt. Dann gab man 1,36 ml 4,43 N HCl (0,006 Mol) in Dioxan und anschließend 0,3 ml iso-Amylnitrit hinzu. Nach 30 Min. bei - 30°C wurde auf - 50°C gekühlt und mit 0,82 ml TAA (0,006 Mol) neutralisiert. Anschließend wurde die gekühlte Lösung der Aminosäurekomponente, 1,8 g (0,002 Mol) Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA in 20 ml HMPT + 20 ml DMF + 0,28 ml TAA (0,02 Mol) hinzugefügt. Dann ließ man über Nacht auf - 10°C kommen, in weiteren 8 Std. auf + 5°C, dann auf Zimmertemperatur, rührte noch einen Tag bei Zimmertemperatur, wobei durch tropfenweise Zugabe von N-Methylmorpholin der pH auf 7,5 - 8 gehalten wurde. Dann rührte man in 1 l Eiswasser ein, fügte etwas Kochsalz hinzu und saugte ab. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und über P₂O₅ getrocknet. Anschließend kochte man mit Methanol aus, saugte ab und trocknete. Man erhielt ein weißes Pulver.

Ausbeute: 2,7 g (84,4 %)

DC : Keine unterschiedlichen R_F-Werte von Carboxylkomponente und Aminosäurekomponente in den Systemen I, II und III, nur in IV und in sec. Butanol/NH₃ (10 %) deutliche Trennung; dabei zeigte sich, daß nur die beiden Ausgangskomponenten vorlagen.

C₇₄H₁₁₅N₁₆S₂O₂₀ (1601)

Aminosäureanalyse:

	His	Cys	Val	Ala	Gln	Ile	Met	Lys
Ber.	1	1	1	3	1	1	1	1
Gef.	0,90	n.b.	0,96	3,00	1,13	1,07	0,86	1,10

5.7. Sequenz 18-25

Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB

4,6 g Boc-Val-Ala-Thr-Ala-OH (0,01 Mol), 6,7 g Thr-Ala-Gln-Ile-ONB x TFA (0,01 Mol) und 9,5 g HOBt (0,015 Mol) wurden in 150 ml DMF gelöst und bei - 10°C erst mit 1,2 ml (0,01 Mol) N-Methylmorpholin und dann mit 2,2 g DCCI (0,011 Mol) in 20 ml DMF versetzt. Unter Rühren ließ man über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Dabei war DC-Harnstoff und Peptid ausgefallen. Nach Absaugen und Waschen mit kaltem DMF, Isopropanol und Wasser wurde 3mal mit Isopropanol ausgekocht.

Ausbeute: 7,8 g (78 %) Fp. 245°C

$[\alpha]_D^{24} = -15,0$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III einheitlich

C₄₅H₇₂N₁₀O₁₆ (1009,2)

Ber. C 53,56 H 7,19 N 13,88

Gef. C 52,88 H 7,08 N 13,51

Aminosäureanalyse:

	Val	Ala	Thr	Gln	Ile
Ber.	1	3	2	1	1
Gef.	0,99	3,10	2,00	1,00	1,01

Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-OH

4 g (0,004 Mol) Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB wurden in 250 ml DMF auf ca. 100°C erwärmt, bis sich der größte Teil gelöst hatte. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde mit PdO₂ als Katalysator hydriert. Das Erwärmen und Abkühlen wurde mehrmals wiederholt bis eine klare Lösung bestehen blieb und kein Wasserstoff mehr aufgenommen wurde. Dann wurde filtriert, i.V. eingengt und mit Methanol gefällt.

Ausbeute: 3,1 g (86 %) Fp. 227-28°C

$[\alpha]_D^{24} = -12,4$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III, V einheitlich

$C_{38}H_{67}N_9O_{14}$ (902,2)

Ber. C 50,58 H 7,49 N 13,97

Gef. C 49,73 H 7,19 N 14,35

5.8. Sequenz 5-15

Z-Glu(OBut)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB

a) Bereitung der Aminoskomponente:

6,8 g Boc-Glu-Ala-Ala-Thr-Gly-ONB (0,01 Mol) wurden mit TFA wie üblich von der Boc-Schutzgruppe befreit. Nach Einengen und Verreiben mit abs. Äther wurde 2 Std. über P_2O_5/KOH getrocknet, dann in 100 ml DMF gelöst und mit 1,2 ml N-Methylmorpholin neutralisiert.

DC : I, II, III fast einheitlich, Spuren einer ninhydrin-negativen Chlor-Tolidin-positiven Verunreinigung

b) Kupplung

8,6 g (0,01 Mol) Z-Glu(OBut)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH wurden in 150 ml warmem DMF gelöst. Nach Abkühlen auf 0°C gab man die gelöste Aminoskomponente und 2 g HOBt (0,015 Mol) und dann 2,2 g DCCI (0,011 Mol) hinzu. Man rührte 2 Std. im Eisbad und anschließend 24 Std. bei Zimmertemperatur. Nach 3 Std. begann der Ansatz zu gelieren. Es wurde noch DMF zugegeben und heftig weitergerührt. Schließlich wurde abgesaugt, mit DMF und Eiswasser gewaschen und getrocknet. Nach Auskochen mit Isopropanol erhielt man eine schlecht absaugbare Gallerte, von der nach Trocknung 1 g nur noch in 100 ml kochendem DMF löslich waren.

Ausbeute: 9,9 g (70 %) Fp. 238-39°C

$[\alpha]_D^{24} = -5,6$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III noch DC-Harnstoff nachweisbar

$C_{65}H_{90}N_{14}O_{22}$ (1419,6)

Aminosäureanalyse:

	Glu	Ser	Phe	Val	Gly	Ala	Thr
Ber.	3	1	1	1	2	2	1
Gef.	2,94	0,93	0,97	0,98	2,00	1,99	0,94

5.9. Sequenz 1-10

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH

17,6 g Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH x TFA (0,02 Mol) und 15,4 g Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-ONp (0,02 Mol) wurden bei 0°C in 300 ml DMF gelöst, dann ließ man unter Rühren 5,6 ml TÄA zutropfen. Dabei bildete sich eine gallertige Fällung. Man gab noch 100 ml DMF zu und ließ unter starkem Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen und rührte noch 24 Std. bei Zimmertemperatur. Nach ca. 6 Std. bildete sich eine klare Lösung, Anschließend goß man in 1,5 l Eiswasser. Nach Ansäuern auf pH 4 mit 3 N HCl fiel das Produkt aus. Es wurde abgesaugt, gut abgepreßt und der feuchte Filterkuchen in ca. 800 ml kochendem Äthanol aufgenommen. Beim Abkühlen fiel das Produkt in gut absaugbarer Form aus. Es wurde abgenutscht und mit Äthanol und Äther ausgewaschen und i.V. getrocknet. Das Peptid ist löslich in warmem DMF.

Ausbeute: 23 g (70,3 %) Fp. 217-18°C

$[\alpha]_D^{24} = -13,2$ (c = 0,5, DMF)

DC : I, II, III, IV einheitlich, in I etwas Schwanzbildung

$C_{70}H_{92}N_{12}O_{19}$ (1405,6)

Ber.	C 59,81	H 6,59	N 11,95
Gef.	C 58,58	H 6,69	N 11,58

Aminosäureanalyse:

	Val	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Phe
Ber.	2	1	1	2	2	1	1
Gef.	1,95	0,99	0,99	2,04	2,00	0,86	0,97

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONp

2,8 g Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly (0,002 Mol) wurden in 50 ml warmem DMF gelöst. Nach Abkühlen auf 0°C gab man 560 mg p-Nitrophenol (0,004 Mol) und 800 mg DCCI hinzu und ließ unter Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen DC-Harnstoffs wurde in 300 ml abs. Äther eingerührt und das ausgefallene Produkt abfiltriert.

DC : I, II, III, IV Der p-Nitrophenylester war nur zu ca. 60 % entstanden.

$C_{76}H_{95}N_{13}O_{21}$ (1525)

Referenzen:

- [1] Fr. Schneider und I. Ziegler,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 247-252 (1967)
- [2] T.Y. Liu, W.H. Stains, G. Moore und G.D. Elliott,
Z. physiol. Chem. 348, 147-149 (1965)
- [3] H.C. Ziegler, Fr. Schneider und H. Wenck,
Z. Naturforsch. 25 b, 47-48 (1971)
- [4] Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes, Biochemical Society Symposium No. 11, (Ed. R.W.S. Smellie), Academic Press, London 1970
- [5] G. Lowe und A. Williams,
Biochem. J. 96, 199-204 (1965)
- [6] J.A. Thoms und D.E. Koshland jr.,
J. Mol. Biol. 2, 169-70 (1960)
- [7] K. Wallenfels und C.P. Malhotra,
The Enzymes, Vol. IV, 2 444-51, Second Ed., (Ed. P. Dreyer, H. Lardy, K. Myrback), Academic Press, London 1966
- [8] M. Laskowski und I. Ziegler,
Canad. J. Chem. 39, 1996-1998 (1961)
- [9] B.P. Whitehead und B.R. Rabin,
Biochem. J. 80, 533-39 (1961)
- [10] B.R. Rabin und D.C. Watts,
Nature (London) 206, 1167-68 (1965)
- [11] Fr. Schneider,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1034-42 (1967)
- [12] Fr. Schneider, E. Schaich und H. Wenck,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 197-98 (1965)
- [13] E. Ziegler, H. Wenck und Fr. Schneider,
Z. Naturforsch. 25 b, 1417-20 (1970)
- [14] Fr. Schneider und H. Wenck,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1981-82 (1968)

- [17] K. VILK, H. BACH and F. SCHMIDT,
Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [18] F. SCHMIDT and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [19] K. VILK,
Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [20] K. VILK and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [21] K. VILK and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [22] K. VILK and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [23] K. VILK and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [24] K. VILK and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [25] K. VILK and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [26] K. VILK and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)
- [27] K. VILK and H. BACH,
KERNFORSCHUNG Z. NATURFORSCH. 26, 449 (1971)

- [28] S. Sakakibara, Y. Shimonishi, M. Okada und Y. Kishida,
Peptides 1966, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1967 (Ed. H.C. Beyerman, A. van de Linde, W. Massen van
den Brink), S. 44-49
- [29] J. Föhles,
Dissertation, TH Aachen 1972
- [30] E. Schröder und K. Lübke,
Peptides 1971, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1973 (Ed. H. Nesvadba), S. 89-95
- [31] G.F. Holland und L.A. Cohen,
J. Amer. Chem. Soc. 80, 3765-69 (1958)
- [32] K. Hammerström, Dissertation, TH Aachen 1968
- [33] H. Zahn und K. Hammerström,
Chem. Ber. 102, 1048-52 (1969)
- [34] K. Hammerström, W. Lunkenheimer und H. Zahn,
Makromolekulare Chemie 133, 41 (1970)
- [35] A. Wittinghofer,
Diplomarbeit, TH Aachen 1968
- [36] E. Schwertner,
Diplomarbeit, TH Aachen 1969
- [37] P. Sieber und B. Iselin,
Helv. Chim. Acta 51, 614-22, 622-32 (1968)
- [38] P. Sieber und B. Iselin,
Helv. Chim. Acta 52, 1525-31 (1969)
- [39] S.S. Wang und R.B. Merrifield,
Int. J. Protein Research 1, 235 (1969)
J. Amer. Chem. Soc. 91, 6488-91 (1969)
- [40] E. Schnabel, G. Schmidt und E. Klauke,
Liebigs Ann. Chem. 743, 69-76 (1971)
- [41] R.S. Feinberg und R.B. Merrifield,
Tetrahedron 1972, 5865-71
- [42] N. Inukai, K. Nakano und M. Murakami,
Bull. Chem. Soc. Japan 40, 2913-18 (1967)

- [43] U. Weber,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1421-24 (1968)
- [44] U. Weber, K.H. Herzog, H. Grossmann, S. Hörnle
und G. Weitzel,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1425-29 (1969)
- [45] U. Weber und P. Hartter,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 1384-88 (1970)
- [46] U. Weber, P. Hartter und L. Flohé,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 1389-94 (1970)
- [47] P. Hartter und U. Weber,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 354, 365-370 (1973)
- [48] A. Loffet,
Experientia 23, 406-07 (1967)
- [49] B. Gutte und R.B. Merrifield,
J. Amer. Chem. Soc. 91, 501 (1969)
- [50] R.B. Merrifield,
J. Org. Chem. 29, 3100-3102 (1964)
- [51] F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnasson, R. Akhtar
und N.M. Khan,
Tetrahedron Letters 1966, 3483-87
- [52] F. Chillemi, P.G. Pietta und A. Corbellini,
Peptides 1968, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1968 (Ed. E. Bricas), S. 104-107, 107-110
- [53] H.C. Beyerman und D. van den Berg,
zit. in [54]
- [54] H.C. Beyerman, T.S. Lie und C.J. Van Veldhuizen,
Peptides 1971, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1973 (Ed. H. Nesvadba), S. 162-64
- [55] L.D. Dorman,
Tetrahedron Letters 1969, 2319-21
- [56] F. Weygand und R. Obermeier,
Z. Naturforsch. 23 b, 1390-92 (1968)

- [57] S. Hörnle und W. Geising,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 5 (1971)
Dissertation W. Geising, Univ. Tübingen 1970
- [58] K. Esko, S. Karlsson und J. Porath,
Acta Chem. Scand. 22, 3342-44 (1968)
- [59] H. Eckstein,
Dissertation, Univ. Tübingen 1970
- [60] R.B. Merrifield,
J. Amer. Chem. Soc. 86, 304-05 (1964)
- [61] H. Wissmann und R. Geiger,
Angew. Chem. 82, 937 (1970)
- [62] Th. Wieland, Chr. Birr und H. Wissenbach,
Angew. Chem. 81, 782-83 (1969)
- [63] E. Wünsch,
Angew. Chem. 83, 773-782 (1971)
- [64] M. Ohno und C.B. Anfinsen,
J. Amer. Chem. Soc. 89, 5994-95 (1967)
- [65] H.C. Beyerman, H. Hindriks und E.W.B. De Leer,
Chem. Comm. 1968, 1668
- [66] M. Bodanszky und J.T. Sheehan,
Chem. Ind. (London) 1964, 1423-24
- [67] T. Curtius,
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 35, 3226-28 (1902)
- [68] J. Honzl und J. Rudinger,
Coll. Czech. Chem. Commun. 26, 2333 (1961)
- [69] D.S. Kemp, S.W. Wang, G. Busby III und G. Hugel,
J. Amer. Chem. Soc. 92, 1043-55 (1970)
- [70] K. König und R. Geiger,
Chem. Ber. 103, 788-98 (1970)
- [71] F. Weygand, A. Prox und W. König,
Chem. Ber. 99, 1451-60 (1966)

- [72] G.W. Anderson, J.E. Zimmerman und F.M. Callahan,
J. Amer. Chem. Soc. 88, 1338-39 (1966)
- [73] P. Sieber, B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber und
W. Rittel,
Helv. Chim. Acta 53, 2135-50 (1970)
- [74] P. Sieber und B. Riniker,
Peptides 1971, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1973 (Ed. H. Nesvadba), S. 49-53
- [75] G.W. Anderson, J.E. Zimmerman und F.M. Callahan,
J. Amer. Chem. Soc. 89, 5012-17 (1967)
- [76] P.G. Pietta und G.R. Marshall,
Chem. Comm. 1970, 650-51
- [77] W. König und R. Geiger,
Chem. Ber. 103, 2041-51 (1970)
- [78] E. Schnabel, H. Herzog, P. Hoffmann, E. Klauke und
I. Ugi,
Liebigs Ann. Chem. 716, 175-85 (1968)
- [79] E. Schnabel, J. Stoltefuß, H.K. Offe und E. Klauke
Liebigs Ann. Chem. 743, 57-68 (1971)
- [80] D. Yamashiro, J. Blake und C.H. Li,
J. Amer. Chem. Soc. 94, 2855-59 (1972)
- [81] US-Patent 3247182
- [82] I. Phocas, C. Yovanidis, I. Photaki und L. Zervas,
J. Chem. Soc. (c) 1970 (London), 1506-09
- [83] S. Sakakibara und T. Fujii,
Bull. Chem. Soc. Japan 42, 1466 (1969)
- [84] s. [20], S. 1066
- [85] F. Weygand, W. Steglich, A. Maierhofer und A. Bauer,
Chem. Ber. 101, 1894-95 (1968)
F. Weygand, W. Steglich und P.G. Pietta,
Chem. Ber. 100, 3841-49 (1967)

- [86] F. Chillemi und R.B. Merrifield,
Biochemistry 8, 4344-4346 (1969)
- [87] E. Schnabel,
Liebigs Ann. Chem. 702, 188-196 (1967)
- [88] W.L. Haas, E.V. Krumkalns und K. Gerzon,
J. Amer. Chem. Soc. 88, 1988-92 (1966)
- [89] P. Henkart,
J. biol. Chem. 246, 2711-13 (1971)
- [90] H.A. Staab,
Angew. Chem. 74, 407-23 (1962)
- [91] S. Shaltiel,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 178-81 (1967)
- [92] B.W. Erickson und R.B. Merrifield,
in: Chemistry and Biology of Peptides,
Proceedings of the 3rd Amer. Peptide Symposium,
(Ed. J. Meienhofer), Ann Arbor Science Publ. Inc.,
Ann Arbor 1973, S. 191-95
- [93] D. Yamashiro und C.H. Li,
J. Amer. Chem. Soc. 95, 1310-15 (1973)
- [94] K.T. Wang, J. Blake und C.H. Li,
Int. J. Peptide Protein Res. 5, 33-36 (1973)
- [95] A. Yaron und S.F. Schlossman,
Biochemistry 7, 2673-81 (1968)
- [96] E. Schnabel, H. Klostermeyer und H. Berndt,
Liebigs Ann. Chem. 749, 90-108 (1971)
- [97] D. Yamashiro, R.L. Noble und C.H. Li,
in [92], S. 197-202
- [98] S. Sakakibara, T. Fukuda, Y. Kishida und I. Honda,
Bull. Chem. Soc. Japan 43, 3322 (1970)
- [99] G.H.L. Nefkens, G.I. Tesser und R.J.F. Nivard,
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 79, 688-98 (1960)

- [100] R. Schwyzer, A. Costapanagiotis und P. Sieber,
Helv. Chim. Acta 46, 870-89 (1963)
- [101] A. Neuberger und F. Sanger,
Biochem. J. 37, 515-18 (1943)
- [102] U. Weber,
pers. Mitteilung
- [103] P.G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut,
J. Amer. Chem. Soc. 88, 166-67 (1966)
- [104] F. Chillemi, P.G. Pietta und A. Corbellini,
Peptides 1968, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1968, S. 104-06, S. 107-110 (Ed. E. Bricas)
- [105] H. Wilson und R. Cannan,
J. biol. Chem. 119, 309 (1937)
- [106] J. Rudinger und Z. Pravda,
Coll. Czech. Chem. Comm. 23, 1947 (1958)
- [107] F. Chillemi,
Gazz. Chim. Ital. 93, 1079-92 (1963)
- [108] F. Chillemi, L. Bernardi und G. Bosisio,
Gazz. Chim. Ital. 94, 891-901 (1964)
- [109] A. Corbellini, F. Chillemi und P.G. Pietta,
Gazz. Chim. Ital. 97, 514-25 (1967)
- [110] D. Theodoropoulos und J. Souchleris,
Acta Chim. Hung. 44, 183 (1965)
- [111] R. Geiger, K. Sturm und W. Siedel,
Chem. Ber. 96, 1080-87 (1963)
- [112] Fr. Schneider,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 320, 82-91 (1960)
- [113] E. Schnabel, H. Klostermeyer, J. Dahlmans und H. Zahn,
Liebigs Ann. Chem. 707, 227-41 (1967)
- [114] W. Parr und K. Grohmann,
in [92], S. 169-173

- [115] E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W.A. König,
W. Brüning, H. Hagenmaier und W. Parr,
J. Amer. Chem. Soc. 92, 1735-38 (1970)
- [116] M. Mutter,
Dissertation Universität Tübingen 1972
M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer,
Angew. Chem. 83, 883-84 (1971)
- [117] E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung, W. Parr,
H. Eckstein, P. Hunziker und R.E. Sieverts,
Peptides 1969, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1971 (Ed. E. Scoffone), S. 65-73
- [118] H. Hagenmaier und H. Frank,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1973-76
(1972)
- [119] F. Flor,
Vortrag bei der DFG-Arbeitstagung über Peptidsynthesen
Heidelberg, 7.-9. Dez. 1972
- [120] F. Weygand,
Peptides 1968, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1968 (Ed. E. Bricas), S. 183-84
- [121] C.B. Anfinsen, D. Ontjes, M. Ohno, L. Corley und
A. Eastlake,
Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1806-1811 (1967)
- [122] U. Weber,
Vortrag beim Symposium Chemie des Insulins und
Proinsulins, Aachen, 12. und 13. Juli 1973
- [123] E. Wünsch und F. Drees,
Chem. Ber. 99, 110-20 (1966)
- [124] F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch,
Z. Naturforsch. 21 b, 426-28 (1966)
- [125] F. Drees,
pers. Mitteilung

- [126] M. Bremer, A. Niederwieser und G. Pataki,
in: E. Stahl, Dünnschichtchromatographie,
Springer-Verlag, Heidelberg (1962)
- [127] F. Reindel und W. Hoppe,
Chem. Ber. 87, 1103-07 (1954)
- [128] G. Pataki,
J. Chromatogr. 12, 541 (1963)
- [129] H. Pauly,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 42, 517 (1904)
H. Pauly und A. Binz,
Z. Farben und Textilind. 3, 373 (1904)
- [130] E. Wünsch und E. Jaeger,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 346, 301-02 (1966)
- [131] R. Nietzki und E. Braunschweig,
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27, 3381-84 (1894)
- [132] E. Müller und G. Zimmermann,
J. prakt. Chem. 111, 277-92 (1925)
- [133] Organikum, Org. Chem. Grundpraktikum
11. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften
Berlin 1972, S. 354
- [134] D.T. Mowry, J. Dazzi, M. Renoll und R.W. Shortridge,
J. Amer. Chem. Soc. 70, 1916-17 (1948)
- [135] L.A. Carpino,
J. Amer. Chem. Soc. 79, 98-101 (1957)
- [136] s. [20], S. 890
- [137] R.A. Boissonnas und P. Preitner,
Helv. Chim. Acta 36, 875-86 (1953)
- [138] F.H. Carpenter und D.T. Gish,
J. Amer. Chem. Soc. 74, 3818-21 (1952)
- [139] K. Noda, S. Terada und N. Izumiya,
Bull. Chem. Soc. Japan 43, 1883-85 (1970)

- [140] F. Weygand und K. Hunger,
Chem. Ber. 95, 1-6 (1962)
- [141] M.T. Bogert und A. Stull,
Organic Synthesis, Coll. Vol. I, S. 220-21
John Wiley and Sons Inc. New York
- [142] M.H. Hubacher,
Organic Synthesis, Coll. Vol. II, S. 455-57
John Wiley and Sons Inc. New York
- [143] A. Basler,
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 16, 2714-20 (1883)
- [144] s. [133], S. 544
- [145] Organikum, Org. Chem. Grundpraktikum
4. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften
Berlin, 1964, S. 298
- [146] H. Schnakenberg und R. Scholl,
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 36, 654-55 (1903)
- [147] s. [133], S. 468
- [148] K.W. Pepper, H.M. Paisley und M.A. Young,
J. Chem. Soc. (London) 1953, 4097-4105
- [149] H. Zahn und H. Schüssler,
Liebigs Ann. Chem. 641, 176-183 (1961)
- [150] R.H. Mazur und J.M. Schlatter,
J. org. Chem. 28, 1025-29 (1963)
- [151] W.K. Park, R.R. Smeby, F.M. Bumpus,
Biochemistry 6, 3458-3464 (1967)
- [152] M. Bergmann und L. Zervas,
Chem. Ber. 65, 1192-1201 (1932)
- [153] M. Goodman und K.C. Stueben,
J. Amer. Chem. Soc. 81, 3980-83 (1959)
- [154] K. Hofmann, R. Schmiechen, R.D. Wells, Y. Wolman
und N. Yanaihara,
J. Amer. Chem. Soc. 87, 611-19 (1965)

- [155] S. Sakakibara, Y. Nobuhara, Y. Shimonishi und R. Kiyoi,
Bull. Chem. Soc. Japan 38, 120-123 (1965)
- [156] M. Bodanszky und V. Du Vigneaud,
J. Amer. Chem. Soc. 81, 2504-2507 (1959)
- [157] H. Zahn, W. Danho und B. Gutte,
Z. Naturforsch. 21 b, 763-773 (1966)
- [158] E. Wünsch und A. Zwick,
Chem. Ber. 97, 2497-2503 (1964)
- [159] S. Guttmann und R.A. Boissonnas,
Helv. Chim. Acta 41, 1852-1867 (1958)
- [160] C.H. Li, B. Gorup, D. Chung und J. Ramachandran,
J. org. Chem. 28, 178-181 (1963)
- [161] E. Schröder und E. Klieger,
Liebigs Ann. Chem. 673, 196-207 (1964)
- [162] S. Goldschmidt und C. Jutz,
Chem. Ber. 86, 1116-21 (1953)
- [163] W.J. Le Quesne und G.T. Young,
J. Chem. Soc. (London) 1950, 1954-63
- [164] H. Gibian und E. Klieger,
Liebigs Ann. Chem. 640, 145-56 (1961)
- [165] E. Klieger und H. Gibian,
Liebigs Ann. Chem. 655, 195-210 (1962)
- [166] E. Schnabel,
Z. Naturforsch. 19 b, 120-24 (1964)
- [167] s. [20], S. 929
- [168] E. Schröder,
Liebigs Ann. Chem. 692, 241-45 (1966)
- [169] V. Du Vigneaud und O.K. Behrens,
J. biol. Chem. 117, 27 (1937)
- [170] S. Akabori, S. Sakakibara und S. Shiina
Bull. Chem. Soc. Japan 31, 784-85 (1968)

- [171] B.O. Handford, T.A. Hylton, K.T. Wand und B. Weinstein,
J. org. Chem. 33, 4251-55 (1968)
- [172] E. Schröder und H. Gibian,
Liebigs Ann. Chem. 656, 190-204 (1962)
- [173] J.E. Shields, W.H. McGregor und F.H. Carpenter,
J. org. Chem. 26, 1491-94 (1961)
- [174] R. Schwyzer und W. Rittel,
Helv. Chim. Acta 44, 159-69 (1961)
- [175] H. Klostermeyer, J. Halstrøm, P. Kusch, J. Föhles
und W. Lunkenheimer,
Peptides 1966, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam
1967 (Ed. H.C. Beyerman, A. van de Linde, W. Massen
van den Brink), S. 113-116
- [176] B. Bezas und L. Zervas,
J. Amer. Chem. Soc. 83, 719-22 (1961)
- [177] T. Shiba und T. Kaneko,
Bull. Chem. Soc. Japan 33, 1721-31 (1960)
- [178] R.A. Boissonnas, St. Guttman, R.L. Huguenin,
P.A. Jaquenoud und E. Sandrin,
Helv. Chim. Acta 41, 1867-82 (1958)
- [179] K. Hofmann, W. Haas, M.J. Smithers und
G. Zanetti,
J. Amer. Chem. Soc. 87, 631-639 (1965)
- [180] W. Grassmann und E. Wunsch,
Chem. Ber. 91, 462-65 (1958)
- [181] M. Bodanszky und V. Du Vigneaud,
J. Amer. Chem. Soc. 81, 6072-75 (1959)
- [182] Houben-Weyl,
Methoden der Org. Chemie, 4. Auflage
(Herausg. Eugen Müller), Thieme-Verlag, Stuttgart
1960, V/4 S. 64

- [183] W. Grassmann und E. Wünsch , P. Deufel und A. Zwick,
Chem. Ber. 91, 538-41 (1958)
- [184] K. Okawa,
Bull. Chem. Soc. Japan 29, 486-89 (1956)
- [185] Hoppe-Seyler-Tierfelder
Handbuch der Physiologisch- u. Pathologisch Chem.
Analyse, VII₂, Springer Verlag, Berlin 1964,
S. 1670
- [186] E. Wünsch und G. Fürst,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 329, 109-112
(1962)
- [187] H. Zollner,
Dissertation, Universität Tübingen, 1969
- [188] E. Wünsch und J. Jentsch,
Chem. Ber. 97, 2490-96 (1964)
- [189] s. [20], S. 895 und [149]
- [190] K. Eisele,
Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1968
- [191] G.W. Anderson, J.E. Zimmerman und F.M. Callahan,
J. Amer. Chem. Soc. 86, 1839-42 (1964)
- [192] A. Marglin und R.B. Merrifield,
J. Amer. Chem. Soc. 88, 5051-52 (1966)
- [193] A. Roedig,
in: Houben-Weyl, Meth. der Organ. Chemie,
4. Auflage (Herausg. Eugen Müller), Thieme Verlag
Stuttgart, 1960, Bd. V/4, S. 19

Danksagung

Für die Durchführung der Aminosäureanalysen danke ich Frau Dr. A.M. Fretzdorff (Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen), Frau Dr. C. Ebert (Institut für Biopolymere der Universität Marburg), Herrn Dr. J. Föhles (Deutsches Wollforschungsinstitut, Aachen) und Herrn Dipl.-Biochem. H.G. Löffler (Physiologisch-Chemisches Institut II der Universität Marburg).

Frau Dr. A.M. Fretzdorff danke ich auch für die Durchführung eines Teils der C-H-N-Bestimmungen, ebenso Herrn Pfeiffer von der Zentralen Analytik des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg.

Fräulein L. Kraft war mir während der letzten Zeit der Arbeit durch fleißige und geschickte Mitarbeit eine wertvolle Hilfe. Frau R. Sauer danke ich für die Anfertigung der Zeichnungen.

Lebenslauf

Am 10.11.1938 wurde ich in Metzingen/Württ. als Sohn des Eugen Schaich und seiner Ehefrau Emma, geb. Röhm, geboren.

Am September 1945 besuchte ich 4 Jahre lang die Volksschule Metzingen und dann für 6 Jahre das damalige Progymnasium Metzingen. Nach anschließendem dreijährigen Besuch des Johannes-Kepler-Gymnasiums Reutlingen legte ich dort am 26. März 1957 die Reifeprüfung ab. Nach einjähriger Praktikantenzeit in Betrieben der Holzwirtschaft begann ich im SS 1958 das Studium der Holzwirtschaft an der Universität Hamburg, das ich im SS 1962 mit der Diplomprüfung für Holzwirte abschloß. Von März 1961 bis Dezember 1961 arbeitete ich im Institut für Holzchemie und Chemische Technologie des Holzes der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft in Reinbek bei Hamburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Sandermann an meiner Diplomarbeit: Chemische Untersuchungen über aromatische Verbindungen und ihre biogenetischen Vorstufen in den Assimilationsorganen der Rotbuche und den jahreszeitlichen Verlauf ihres Auftretens.

Nach zweijähriger Tätigkeit als wiss. Angestellter im genannten Institut studierte ich ab SS 1964 Biochemie an der Universität Tübingen, wo ich im SS 1968 die Diplomprüfung für Biochemiker bestand. Von April bis Dezember 1967 arbeitete ich am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider an meiner biochemischen Diplomarbeit: Modellreaktionen zur kooperativen Imidazol-SH-Katalyse: Synthese und katalytische Eigenschaften von Cystein- und Histidin-enthaltenden Peptiden.

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider in der Zeit von September 1968 bis August 1970 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen und anschließend bis August 1973 am Physiologisch-Chemischen Institut II der Universität Marburg/Lahn durchgeführt.

Von Mai 1966 bis August 1970 war ich wiss. Hilfskraft und ab März 1969 Verwalter einer wiss. Assistentenstelle in Tübingen. Seit September 1970 bin ich als wiss. Angestellter am Physiol.-Chemischen Institut II der Universität Marburg/Lahn tätig.

